

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 749**

21 Número de solicitud: 201230846

51 Int. Cl.:

**A61K 39/005** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.06.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.12.2013**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (100.0%)**

**Serrano, 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**THOMAS CARAZO, M<sup>a</sup> Carmen;  
EGUI MACHADO, Adriana y  
LÓPEZ LÓPEZ, Manuel Carlos**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **Biomarcadores de la enfermedad de Chagas**

57 Resumen:

Biomarcadores de la enfermedad de Chagas.

La presente invención pertenece al campo de la inmunología, parasitología y de las enfermedades infecciosas, en particular se refiere a la enfermedad de Chagas causada por el parásito Trypanosoma cruzi. La presente invención se refiere a un péptido reconocido por células mononucleares de pacientes de la enfermedad de Chagas y a una molécula quimérica que lo comprende. Se refiere también a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido y/o molécula quimérica y a su uso para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Asimismo, se refiere al uso de dicho péptido o dicha molécula quimérica como biomarcador de la infección por T. cruzi, de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y del impacto terapéutico del tratamiento de dicha enfermedad.

ES 2 433 749 A1

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de la enfermedad de Chagas

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la inmunología, parasitología y enfermedades infecciosas, en particular se refiere a un péptido reconocido por células mononucleares de pacientes de la enfermedad de Chagas y a una molécula quimérica que lo comprende. Asimismo, se refiere al uso de dicho péptido o molécula quimérica como biomarcadores de la enfermedad de Chagas y en inmunoterapia frente a dicha enfermedad.

10 **Antecedentes de la invención**

15 *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Este parásito protozoario afecta a casi 10 millones de personas en América Latina, y aproximadamente 75-90 millones de personas están en riesgo de infección. Existen diferentes fases de la patología de la enfermedad de Chagas. La fase aguda se produce poco después de la infección, tiene una duración de dos a tres meses aproximadamente y en la mayoría de los casos presenta síntomas inespecíficos que dificultan su diagnóstico. En ausencia de tratamiento, la fase aguda es seguida por una fase crónica indeterminada en la que los parásitos persisten en los tejidos, donde el paciente está infectado pero no tiene sintomatología. Para el 30-40% de pacientes esta fase deriva en una fase crónica sintomática caracterizada principalmente por la existencia de alteraciones cardíacas y/o digestivas (referida en adelante como CCC/DIG), a la cual se asocia con una alta morbilidad. En esta fase crónica sintomática se observa la aparición de cardiomegalia, anormalidades electrocardiográficas, arritmias, aperistalsis, megaesófago y megacolon, pudiendo llegar a causar la muerte. Esta fase tiene distintos grados de severidad/gravedad (I, II, III) dependiendo de las alteraciones del órgano en cuestión, motivadas por el daño tisular que ocasiona el parásito (Kuschnir et al., 1985. Arq Bras Cardiol 45, 249-56).

Actualmente no existe ninguna vacuna que confiera protección contra *Trypanosoma cruzi*, si se dispone, no obstante, de fármacos para tratar esta enfermedad, como Nifurtimox, desarrollado en 1960 por Bayer, y Benznidazol, desarrollado en 1974 por Roche. Estos fármacos han mostrado ser muy efectivos en pacientes en fase aguda de la enfermedad, sin embargo, su eficacia en la fase crónica está bajo estudio y existen ciertas controversias sobre la misma y consecuentemente sobre su utilización de forma generalizada. Además, estas drogas tienen, frecuentemente, múltiples efectos secundarios caracterizados por manifestaciones digestivas, cutáneas y hematológicas de diferente grado de intensidad. Por lo tanto, los tratamientos quimioterapéuticos actualmente empleados pueden ser altamente tóxicos y poco eficientes en la fase crónica de la enfermedad. Destacar que un importante problema de estos tratamientos es que con ellos la respuesta desencadenada no es suficiente para el aclaramiento total del parásito persistiendo estos durante muchos años en los tejidos del paciente. A este respecto, una molécula eficaz como vacuna "preventiva o terapéutica" debe inducir una respuesta inmunitaria antígeno-específica tanto humoral como celular, desbalanceada hacia un perfil Th1/Tc1, y activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) cuya presencia es crucial para producir el aclaramiento total de *T. cruzi* y por tanto el control de la infección (revisado en Cazorla et al. 2009. *Expert Rev Vaccines* 88(7):922-935; Quijano-Hernández y Dumonteil 2011 *Human Vaccine* 7(11):1184-91).

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en la actualidad se realiza principalmente mediante técnicas serológicas convencionales como las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación, las cuales tienen una alta sensibilidad y especificidad. Los tests comerciales que actualmente se emplean utilizan extractos de proteínas totales del parásito o combinaciones de antígenos recombinantes. Sin embargo, ninguno de estos métodos de diagnóstico es eficaz para determinar el estatus clínico del paciente en su fase crónica, es decir, para diferenciar las distintas fases de la fase crónica de la enfermedad de Chagas (IND, CCC/DIG). Además, en general, estos sistemas de diagnóstico serológico aunque permiten detectar anticuerpos en suero de pacientes crónicos, resultan poco útiles para evaluar la evolución de los pacientes bajo tratamiento, ya que los niveles de anticuerpos persisten, de forma estable, durante mucho tiempo (en aquellos casos en que el tratamiento funcione pueden llegar a mantenerse más de diez años). Por último, la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) si bien puede resultar útil para identificar fallo terapéutico cuando la detección de DNA de *T. cruzi* en sangre periférica es positiva, no permite predecir el éxito del tratamiento puesto que incluso la obtención de repetidos resultados de PCR negativos no son indicativos, necesariamente, de cura parasitológica. De hecho, no hay una correlación directa entre resultados de PCR negativos e infección por *T. cruzi*. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico disponibles actualmente no permiten detectar la dinámica de respuesta después del tratamiento ni, por tanto, reconocer los casos en que la terapia no es efectiva.

A la vista de lo expuesto, actualmente sigue existiendo la necesidad de identificar moléculas que permitan

establecer la dinámica de la respuesta inmunitaria antiparasitaria durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas en pacientes infectados por *T. cruzi* y tras el tratamiento. Dichas moléculas son fundamentales para establecer marcadores que permitan diagnosticar la enfermedad y determinar en qué fase crónica de la enfermedad se encuentra el paciente, además de permitir evaluar la eficacia o impacto terapéutico del tratamiento recibido por un paciente. Asimismo, existe la necesidad de identificar epitopos y fragmentos antigénicos capaces de inducir una respuesta CTL antígeno específica capaz de controlar la infección por *T. cruzi*. En este sentido, la presente invención se refiere a un péptido capaz de inducir una respuesta CTL antígeno específica en pacientes con la enfermedad de Chagas y a las aplicaciones del mismo. Ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes de la descripción detallada que sigue.

### **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere en un aspecto a un péptido (péptido de la invención) caracterizado porque su secuencia aminoacídica se selecciona del grupo formado por: las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 de la proteína paraflagelar PFR2 de *T. cruzi*, las secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 de la proteína paraflagelar PFR3 de *T. cruzi* y las secuencias que comparten al menos un 80% de homología con las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

En otro aspecto, se refiere a una molécula quimérica (molécula quimérica de la invención) formada por la unión de uno o varios péptidos de la invención y una o varias secuencias espaciadoras.

La presente invención se refiere también a una molécula de ADN (molécula de ADN de la invención) que codifica el péptido de la invención o la molécula quimérica de la invención y a un vector que comprende dicha molécula de ADN. Asimismo se refiere a una célula transformada con dicho vector.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de uno o varios péptidos de la invención, de una o varias moléculas quiméricas de la invención y/o de una o varias moléculas de ADN de la invención, como biomarcador para la identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica y para la evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas.

Asimismo, se refiere a una composición farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende uno o varios péptidos de la invención, y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención, y/o una o varias moléculas de ADN de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se refiere también al uso de la composición farmacéutica de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sola o en combinación con otras inmunoterapias o medicamentos quimioterapéuticos.

La presente invención se refiere en otro aspecto a un método de identificación de la fase de la enfermedad de Chagas en su fase crónica (primer método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas de la invención) que comprende:

a) incubar uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas, y

b) medir la concentración de citocinas proinflamatorias y el nivel de actividad citotóxica en dicha muestra,

donde una mayor concentración de citocinas proinflamatorias y la presencia de células con actividad citotóxica péptido-específica en un nivel superior a los valores detectados en células mononucleares de dicho paciente no estimuladas, se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

Además, se refiere en otro aspecto a un método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica (segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas de la invención) que comprende:

i) incubar un péptido de secuencia SEQ ID NO 1 o un péptido cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología con el péptido de SEQ ID NO 1 o una molécula quimérica que comprende alguno de dichos péptidos con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con enfermedad de Chagas, y

ii) medir el nivel de actividad citotóxica en dicha muestra, donde la presencia de células con actividad citotóxica péptido-específica en un nivel superior a los valores detectados en células mononucleares de dicho paciente no estimuladas, se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

La presente invención se refiere en otro aspecto a un método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas (método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de

la invención) que comprende las siguientes etapas:

A) incubar uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas pre-tratamiento y con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas post-tratamiento, y

B) medir el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra pre-tratamiento y en la muestra post-tratamiento, donde un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra post-tratamiento que en la muestra pre-tratamiento se asocia con la efectividad del tratamiento recibido.

Por último, la presente invención se refiere a un kit que comprende uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención y/o una o varias moléculas de ADN de la invención para llevar a cabo el primer y/o segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y/o el método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la invención. Y se refiere también al uso de dicho kit para llevar a cabo el primer y/o segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y/o el método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la invención.

### **Breve descripción de las figuras**

**Figura 1.** Detección en pacientes con la enfermedad de Chagas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> PFR2<sub>156-163</sub> -específicos por citometría de flujo pre- y post-tratamiento con benznidazol. Se muestra un Plot con el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente al dextrámero de PFR2<sub>156-163</sub>. La población positiva para ambos marcadores corresponde al cuadrante superior derecho.

**Figura 2.** Detección en pacientes con la enfermedad de Chagas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> PFR2<sub>449-457</sub> -específicos por citometría de flujo pre- y post-tratamiento con benznidazol. Se muestra un Plot con el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente al dextrámero de PFR2<sub>449-457</sub>. La población positiva para ambos marcadores corresponde al cuadrante superior derecho.

**Figura 3.** Detección en pacientes con la enfermedad de Chagas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> PFR3<sub>428-436</sub> -específicos por citometría de flujo pre- y post-tratamiento con benznidazol. Se muestra un Plot con el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente al dextrámero de PFR3<sub>428-436</sub>. La población positiva para ambos marcadores corresponde al cuadrante superior derecho.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere en un aspecto a un péptido (en adelante péptido de la invención) caracterizado porque su secuencia aminoacídica se selecciona del grupo formado por: las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 de la proteína paraflagelar PFR2 de *T. cruzi*, las secuencias SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 de la proteína paraflagelar PFR3 de *T. cruzi* y las secuencias que comparten al menos un 80% de homología con las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

En una realización particular, la secuencia aminoacídica del péptido de la invención se selecciona del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. En una realización particular, la secuencia del péptido de la invención tiene al menos un 90% de homología con una secuencia seleccionada del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. En otra realización particular, la secuencia aminoacídica del péptido de la invención se selecciona del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 6, y de manera más particular SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 6.

En el contexto de la presente invención se entiende por péptido una secuencia de aminoácidos de 9 a 11 mer. El péptido de la invención puede ser obtenido por síntesis química o por cualquier otra metodología conocida por el experto en la materia. Inesperadamente, ensayos de unión *in vitro* llevados a cabo con el péptido de la invención muestran que tiene una alta afinidad de unión a la molécula HLA-A\*02:01 (Ejemplo 1, Tabla 1), resultado que demuestra que no existe correlación entre los índices de unión determinados por algoritmos teóricos y aquellos obtenidos en ensayos *in vitro*. Además, ensayos de estabilidad de la unión muestran que el péptido de la invención presenta un estabilidad de unión a la molécula HLA-A\*02:01 de, al menos, 2 horas (datos no mostrados). Por otro lado, el péptido de la invención es reconocido por esplenocitos de ratones transgénicos C57BL/6-A2/K<sup>b</sup> inmunizados (Ejemplo 2), así como por células mononucleares de pacientes con enfermedad de Chagas (Ejemplo 3). Es por ello que el péptido de la invención se considera un epítipo o determinante antigénico. Así, el péptido de secuencia SEQ ID NO 1, 2 ó 3 (o con una secuencia con al menos un 80%, de manera más particular con al menos un 90%, de homología con dichas secuencias) es un epítipo de la proteína

5 PFR2 y el péptido de secuencia SEQ ID NO 4, 5 ó 6 (o con una secuencia con al menos un 80%, de manera más particular con al menos un 90%, de homología con dichas secuencias) es un epítipo de la proteína PFR3. Igualmente, el péptido con una secuencia con al menos un 80%, de manera más particular con al menos un 90%, de homología con las secuencias SEQ ID NO 1, 2 ó 3 es un epítipo de la proteína PFR2 y el péptido con una secuencia con al menos un 80%, de manera más particular con al menos un 90%, de homología con las secuencias SEQ ID NO 4, 5 ó 6 es un epítipo de la proteína PFR3.

10 La presente invención se refiere en otro aspecto a una molécula quimérica (en adelante molécula quimérica de la invención) formada por la unión de uno o varios péptidos de la invención y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. Así, en una realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de uno a varios péptidos de la invención, una o varias secuencias espaciadoras y uno o varios adyuvantes. En otra realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de uno a varios péptidos de la invención, una o varias secuencias espaciadoras y uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de uno a varios péptidos de la invención, una o varias secuencias espaciadoras, uno o varios adyuvantes, y uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. Destacar que la disposición secuencial de los péptidos dentro de la molécula quimérica puede ser variable y cualquiera.

20 En el contexto de la presente invención, una molécula quimérica se refiere a una molécula que contiene uno a varios epítopos inmunogénicos unidos a una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente una o varias moléculas adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. Una secuencia espaciadora se refiere a una secuencia aminoacídica o secuencia nucleotídica, irrelevante desde el punto de vista de tener capacidad de activar el sistema inmunológico y que permite la correcta exposición de los péptidos de la invención al sistema inmune del hospedador (paciente con enfermedad de Chagas). Distintas secuencias aminoacídicas pueden usarse, todas ampliamente conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo: *n* glicinas secuenciales (siendo *n* mayor o igual a 3). Adyuvante se refiere a una molécula que potencia y/o modula la capacidad de respuesta inmunológica de las moléculas a las que se les adiciona. Distintos adyuvantes pueden utilizarse, todos ampliamente conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo secuencias CpG y HSP70 de *T. cruzi* o un fragmento de ésta. Por último, un fragmento proteico se refiere a una secuencia aminoacídica de un tamaño igual o mayor a 20 amino ácidos y menor de 70 amino ácidos. Dicho fragmento proteico puede tener o no capacidad inmunogénica, es decir, puede ser capaz o no de activar una respuesta inmune en el organismo. De manera particular, dicho fragmento proteico se refiere a uno o varios epítopos reconocidos por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de un paciente con enfermedad de Chagas capaces de inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias y de perfil Th1 y/o actividad citotóxica antígeno-específica, como pueden ser epítopos de KMP11 de *T. cruzi*.

40 En una realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de un péptido cuya secuencia se selecciona del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, y una o varias secuencias espaciadoras. En una realización particular, dicha molécula quimérica está formada también por uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de un péptido cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología, y de manera más particular al menos un 90% de homología, con una secuencia seleccionada del grupo formado por las secuencias SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, y una o varias secuencias espaciadoras. En otra realización particular, dicha molécula quimérica está formada también por uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica.

50 En otra realización particular de la molécula quimérica de la invención, ésta está formada por la unión de varios péptidos de la invención, teniendo al menos uno de ellos la secuencia SEQ ID NO 1, y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de varios péptidos de la invención, teniendo al menos uno de ellos una secuencia al menos un 80%, de manera particular al menos un 90%, de homología con la secuencia SEQ ID NO 1, y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular de la molécula quimérica de la invención, ésta está formada por la unión de varios péptidos de la invención, teniendo al menos uno de ellos la secuencia SEQ ID NO 2, y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular, la molécula quimérica de la invención está formada por la unión de varios péptidos de la invención, teniendo al menos uno de ellos una secuencia al menos un 80%, de manera particular al menos un 90%, de homología con la secuencia SEQ ID NO 2, y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios



particular al menos un 90% de homología, con la secuencia SEQ ID NO 3 y un péptido de secuencia SEQ ID NO 6 o un péptido cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología, de manera más particular al menos un 90% de homología, con la secuencia SEQ ID NO 6, y una o varias secuencias espaciadoras, y opcionalmente uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica. En otra realización particular, dicha última molécula quimérica además comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 o un péptido cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología, de manera más particular al menos un 90% de homología, con la secuencia SEQ ID NO 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ADN (moléculas de ADN de la invención) que codifica el péptido de la invención según se ha definido anteriormente o la molécula quimérica de la invención según se ha definido anteriormente. También se refiere a un vector que comprende dicha molécula de ADN, en particular un vector de expresión, y a una célula transformada con dicho vector.

La presente invención se refiere en otro aspecto al uso de uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas y/o una o varias moléculas de ADN de la invención según se ha definido anteriormente como biomarcador para la identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y para la evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas.

En el contexto de la presente invención, un biomarcador se refiere a una molécula de origen biológico y/o químico cuya utilización posibilita la obtención de datos que permiten detectar e indicar características diferenciales entre procesos biológicos, fases de la patología de una enfermedad y/o impactos terapéuticos. La fase de la patología (también referida como fase) se refiere a cada una de las fases o grados de patología en las que se divide la fase crónica de la enfermedad de Chagas y que se clasifican tal y como definen Kurschnir *et al.* (1995. Arq Bras Cardiol 45: 249-256). Brevemente, la fase crónica se divide en fase crónica indeterminada (IND) y en fase crónica con sintomatología cardíaca y/o digestiva (CCC /DIG). La fase crónica indeterminada de la enfermedad de Chagas se corresponde con una fase en la que el paciente está infectado pero no tiene sintomatología. Para el 30-40% de pacientes esta fase deriva en una fase con sintomatología (normalmente cardíaca y/o digestiva) (CCC y/o DIG) que tiene distintos grados de severidad (I, II, III) dependiendo de las alteraciones del órgano en cuestión, motivadas por el daño tisular que ocasiona el parásito. Destacar que en el contexto de la presente invención, se hace referencia indistintamente a un individuo infectado con *T. cruzi* y a un individuo con enfermedad de Chagas.

En cuanto al término impacto terapéutico de un tratamiento, en el contexto de la presente invención, el mismo se refiere a que el tratamiento suministrado sea capaz de modificar algún parámetro medible que esté asociado con una situación de mejoría clínica o fallo terapéutico. Existen distintos parámetros medibles conocidos por el experto en la materia, en algunos la asociación con una situación de mejoría clínica es directa, como por ejemplo, el porcentaje y funcionalidad de las células implicadas en la destrucción del parásito. En otros, dicha asociación es indirecta, como por ejemplo la tasa de anticuerpos frente a antígenos específicos del parásito. Estos parámetros tienen el inconveniente de que pueden estar influenciados por otros factores externos al tratamiento, de manera que su modificación puede no reflejar una situación de mejoría clínica real.

La presente invención se refiere en otro aspecto a una composición farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende uno o varios péptidos de la invención y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención y/o una o varias moléculas de ADN de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende además otro principio activo o medicamento quimioterapéutico y/u otras inmunoterapias.

La composición farmacéutica de la invención es obtenida por diferentes metodologías ampliamente conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo, simple formulación, nanoclusterización, nanoformulación y microencapsulación. La composición farmacéutica de la invención comprende entre otros, y sin limitar el alcance de la presente invención, cualquier tipo de vehiculización, microencapsulación o nanoencapsulación conocido por el experto en la materia. Asimismo, la composición farmacéutica de la invención es administrada por diferentes vías, entre otras, intramuscular, subdérmica, intradérmica, transmucosa, pulmonar, cutánea, inhalación, parenteral, tanto en forma de liberación rápida como sostenida en el tiempo (por ejemplo, mediante microencapsulación).

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso, sola o en combinación con otras inmunoterapias o medicamentos quimioterapéuticos, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención según se ha definido anteriormente, sola o en combinación con otras inmunoterapias o medicamentos quimioterapéuticos,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Asimismo, la presente invención se refiere al uso de uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas y/o una o varias moléculas de ADN de la invención según se ha definido anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sola o en combinación con otras inmunoterapias o medicamentos quimioterapéuticos, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En el contexto de la presente invención un medicamento quimioterapéutico se refiere a un medicamento que tiene actividad antiparasitaria contra *T. cruzi*, como por ejemplo los medicamentos nifurtimox y benznidazol. La inmunoterapia se refiere a moléculas capaces de activar, en el paciente, una respuesta inmunológica capaz de controlar la enfermedad. Actualmente no existen en el mercado inmunoterapias frente a la enfermedad de Chagas, las moléculas de potencial uso como tal, están en fase de desarrollo experimental (Cazorla et al., 2009, *Expert. Rev. Vaccines* 8(7):921-935, pp928.929). Frente a otras enfermedades protozoarias, como leishmaniosis, existe una situación similar (Okwor y Uzonna, 2009, *Immunotherapy* 1(5): 765-76).

En una realización particular de la presente invención, la inmunoterapia se refiere a moléculas conteniendo epítomos capaces de provocar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígenos-específicos en el paciente con enfermedad de Chagas, y concretamente de linfocitos capaces de inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y de perfil Th1 y/o actividad citotóxica antígeno específica.

Una importante ventaja de la composición farmacéutica de la invención, es que el o los péptidos y/o moléculas quiméricas y/o moléculas de ADN que comprende, son capaces de inducir una respuesta T CD8<sup>+</sup> productora de citocinas proinflamatorias de tipo Tc1 (Th1), tales como INF- $\gamma$  y TNF-alfa, y con actividad citotóxica antígeno-específica. Además estos epítomos (péptidos) y antígenos que los contienen (moléculas quimera) están únicamente presentes en kinetoplastidos (trypanosoma, leishmania) y no en células de mamíferos, no activando respuestas celulares frente a antígenos del hospedador (reacciones cruzadas) y por tanto no es posible la lisis de células no infectadas del paciente enfermo de Chagas. Además, otra ventaja se refiere a que los medicamentos actualmente disponibles actúan sobre el parásito libre en la sangre y no frente al internalizado en las células. Sorprendentemente, el péptido o la molécula quimérica de la presente invención (o el ADN que los codifica) tiene capacidad de activar una respuesta celular capaz de atacar directamente a las células infectadas y generar un ambiente de citocinas de tipo Tc1 que facilita la función citotóxica necesaria para el control del parásito en la fase crónica.

La presente invención se refiere en otro aspecto a un método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica (primer método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas de la invención) que comprende las siguientes etapas:

a) incubar uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención con una muestra de células mononucleares circulantes (PBMC) aisladas de sangre periférica de un individuo con la enfermedad de Chagas, y

b) medir la concentración de una o varias citocinas proinflamatorias y el nivel de actividad citotóxica en dicha muestra,

donde una mayor concentración de citocinas proinflamatorias y la presencia de células citotóxicas péptido-específicas frente a los valores detectados en células mononucleares de dicho paciente no estimuladas, se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

Las "células mononucleares circulantes (PBMC) aisladas de sangre periférica de un individuo" también son referidas de aquí en adelante como "células mononucleares aisladas de un individuo". En el contexto de la presente invención, célula estimulada se refiere a aquella célula a la que se incubó con el péptido o molécula quimérica de la invención y célula no estimulada se refiere a aquella célula que está únicamente en medio de cultivo, es decir, no es incubada con el péptido o molécula quimérica de la invención.

En el contexto de la presente invención, citocina proinflamatoria se refiere a una proteína que regula la función de las células que la produce o de otros tipos celulares y que actúa en la respuesta inmune innata y adquirida, como por ejemplo el interferón gamma (INF- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1). Las citocinas proinflamatorias pueden ser detectadas por multitud de metodologías ampliamente conocidas por el experto en la materia, tales como ELISA, técnica CBA (*Cytometric Bead Array*) tal y como se describe en Santander et al. (2007, *Biomédica*, 1:18-27), citometría de flujo tal y como se describe en Planelles et al. (2003, *Clin Exp. Immunol* 131:41-47) y en Marañón et al. (2000, *International Immunol.* 12(12):1685-1693), ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*) tal y como se describe en Díez H. et al. (2006, *Parasite Immunology.* 28(3):101-105) y Bioplex tal y como se describe en Marañón et al. (2011, *Microbes and Infections* 12-13:1025-32). Por su lado, en el contexto de la presente invención, la actividad citotóxica se refiere a linfocitos T que portan el receptor de membrana CD8+, encargados de la función efectora dirigida a neutralizar células infectadas por *T.*



*cruzi* y mediar su destrucción, la cual puede ser evaluada por distintas metodologías conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, citometría de flujo para analizar la presencia superficial del marcador CD107a/b, tal y como se describe en Díez H. *et al.* (2006. *Parasite Immunology*. 28(3):101-105) y en Giraldo *et al.* (2011 *PLoS TND* 5(8):e-1294) o incluso la presencia intra-citoplasmática de granzimas y/o perforinas tal y como se describe en Giraldo *et al.* (2011 *PLoS TND* 5(8):e-1294), medición de perforinas y granzimas mediante ELISPOT y ELISA tal y como se describe en Zuber *et al.* (2005. *J. Immunol Methods*. 302(1-2):13-25) y ensayos de liberación de cromotál y como se describe en Planelles *et al.* (2001. *Infection and Immunity*. 69(10):6558-6563) y en Marañón *et al.* (2001. *Mol Immunol*. 38: 279-287).

En una realización particular del primer método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica, la concentración de una o varias citocinas proinflamatorias se determina mediante un ensayo multiplex y la actividad citotóxica mediante un ensayo ELISPOT para la determinación de Granzima B. En una realización particular de dicho método en la que la concentración de citocinas proinflamatorias se determina mediante un ensayo multiplex y la actividad citotóxica mediante un ensayo ELISPOT para la determinación de Granzima B, una concentración de citocinas proinflamatorias de, al menos, 5 pg/ml y tres veces mayor que los valores detectados en células no estimuladas y un número de células formadoras de puntos de, al menos, 50 por  $1 \times 10^6$  células mononucleares circulantes y dos veces mayor que los valores detectados en células del paciente no estimuladas se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica (segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas de la invención) que comprende las siguientes etapas:

i) incubar un péptido de secuencia SEQ ID NO 1 o un péptido cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología, en particular al menos un 90% de homología, con la SEQ ID NO 1 o una molécula quimérica que lo contenga con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con enfermedad de Chagas, y  
 ii) medir el nivel de actividad citotóxica en dicha muestra,  
 donde la presencia de células citotóxicas péptido-específicas frente a los valores detectados en células mononucleares del mismo paciente no estimuladas, se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

La presente invención se refiere en otro aspecto a un método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas (método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la invención) que comprende las siguientes etapas:

A) incubar uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas pre-tratamiento y con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas post-tratamiento, y

B) medir el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra pre-tratamiento y en la muestra post-tratamiento,  
 donde un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra post-tratamiento que en la muestra pre-tratamiento se asocia con la efectividad del tratamiento recibido.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos hacen referencia a linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el o los péptidos de la invención con que han sido incubadas las células mononucleares aisladas de un individuo. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> molécula quimérica-específicos hacen referencia a linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para la o las moléculas quiméricas de la invención con que han sido incubadas las células mononucleares aisladas de un individuo, específicos por tanto para los epítopos contenidos en dichas moléculas quiméricas.

En una realización particular, dicho método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento se lleva a cabo mediante citometría de flujo usando el o los péptidos de la invención presentado en forma de dextrámeros tal y como se describe en Holst *et al.* (2011, *J. Immunol*. 186: 3994-4007) o tetrámeros tal y como se describe en Lasso *et al.* (2010, *Parasite Immunology*. 32:494-502) y en Giraldo *et al.*, (2011 *PLoS TND* 5(8):e-1294). En el contexto de la presente invención, dextrámero se refiere a la forma multimérica de MHC-clase I formada por un esqueleto de polímero de dextrano portando un número optimizado de MHC-clase I-unido al péptido de la invención y un fluorocromo, y tetrámero se refiere a la forma multimérica de MHC-clase I formada por cuatro cadenas polipeptídicas portando al péptido de la invención y un fluorocromo.

El método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la presente invención mide parámetros directamente relacionados con la mejoría del paciente, como es el porcentaje y funcionalidad de las células implicadas en destrucción de parásito, lo que supone una importante ventaja frente a la detección de parámetros indirectos que pueden estar influenciados por factores externos al tratamiento, no reflejando su modificación una situación real de mejoría clínica.

5 En una realización particular de dicho método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento, la muestra post-tratamiento se toma al menos cuatro meses después de la finalización del tratamiento. En otra realización particular de dicho método, la muestra post-tratamiento se toma 4 meses después de finalizar el tratamiento y en otra realización particular, se toma 18 meses después de la finalización del tratamiento. En otra realización particular, el paciente es tratado con Benznidazol. En otra realización particular, el paciente es tratado con Nifurtimox.

10 Por último, la presente invención se refiere a un kit que comprende uno o varios péptidos y/o una o varias moléculas quiméricas de la invención y/o una o varias molécula de ADN de la invención, para llevar a cabo el primer y/o segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y/o el método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la invención. Asimismo, se refiere al uso de dicho kit para llevar a cabo el primer y/o segundo método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas y/o el método de evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento de la invención.

### 15 **Ejemplos**

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

#### 20 **EJEMPLO 1. Identificación de péptidos con motivos de unión a la molécula HLA-A \*02:01 en las proteínas PFR2 y PFR3 de *T. cruzi*.**

25 La identificación *in silico* de péptidos con motivos de unión a la molécula HLA-A\*02:01 fue llevada a cabo analizando la secuencia deducida de las proteínas paraflagelares 2 y 3 de *T. cruzi* utilizando dos programas bioinformáticos: SYFPEITHI ([www.syfpeithi.de / home.htm](http://www.syfpeithi.de/home.htm)) y BIMAS ([www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)). El primero de estos algoritmos asigna una puntuación a cada uno de estos péptidos según su afinidad teórica a la molécula HLA-A\*02:01, mientras que el BIMAS determina la estabilidad teórica de esta unión. La combinación de ambos algoritmos permitió determinar aquellos péptidos que presentan una media-alta afinidad de unión a la molécula HLA-A\*02:01 escogiéndose cincuenta y seis epítomos candidatos contenidos en las mencionadas proteínas paraflagelares PFR2 y PFR3.

35 Cada uno de estos péptidos candidatos fue sintetizado y posteriormente ensayado para evaluar su capacidad de unión *in vitro* en células T2 (células deficientes en la expresión de moléculas transportadoras de antígenos) (Pogue et al., 1995. Proc Natl Acad Sci U S A. 92, 8166-70). Los resultados mostrados en la Tabla 1 evidencian que tres péptidos contenidos en la proteína PFR2 (PFR2<sub>19-28</sub>, PFR2<sub>156-163</sub> y PFR2<sub>449-457</sub>, en negrita en la Tabla 1A) y tres en la proteína PFR3 (PFR3<sub>428-436</sub>, PFR3<sub>475-482</sub>, PFR3<sub>481-489</sub>, en negrita en la Tabla 1B) presentan una alta afinidad de unión a la molécula HLA-A\*02:01. Así mismo, estos resultados demuestran que no existe correlación entre los índices de unión determinados por algoritmos teóricos y aquellos obtenidos en ensayos *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1.- Índices de unión determinados por algoritmos teóricos y por ensayos de unión *in vitro*

A.-

Péptido	Posición	Secuencia	SYFPEITHI	BIMAS	Índice de fluorescencia
<b>12790</b>	<b>PFR2</b> 19-28	<b>AVPEVTDVTL</b>	22	8	<b>65</b>
12792	PFR2 99-107	LMRVCGLQL	21	2	33
<b>12796</b>	<b>PFR2</b> 156-163	<b>KLEKIEDEL</b>	22	2	<b>52</b>
12798	PFR2 184-193	NLEECMNVTV	25	18	-24
12802	PFR2 346-355	ELERVLQRL	20	0	1
12806	PFR2 436-444	RLQVHQEYL	20	58	35
<b>12807</b>	<b>PFR2</b> 449-457	<b>RLYKTLGQL</b>	25	20	<b>43</b>
12813	PFR2 556-565	KMVEYRAHL	24	221	22

B.-

Péptido	Posición	Secuencia	SYFPEITHI	BIMAS	Índice de fluorescencia
18396	PFR3 28-37	ALAALYELV	25	51	11
18401	PFR3 155-163	ALARDLSDV	28	160	30
18411	PFR3 399-407	MVTRIPQQNL	13	3	49
18414	PFR3 413-420	QLNDIEAEV	26	285	41
<b>18415</b>	<b>PFR3</b> 428-436	<b>FVSCCGELTV</b>	18	28	<b>75</b>
<b>18418</b>	<b>PFR3</b> 475-482	<b>DIIEQMKGV</b>	21	7	<b>86</b>
<b>18420</b>	<b>PFR3</b> 481-489	<b>GVSGVINAL</b>	23	4	<b>90</b>
18421	PFR3 498-506	QLFQSVEKGV	21	257	34

**EJEMPLO 2. Respuesta citotóxica en esplenocitos de ratones transgénicos C57BL/6-A2/K<sup>b</sup> inmunizados**

5 Para evaluar la capacidad de inducir una respuesta citotóxica específica de los péptidos de la invención, se siguió el procedimiento descrito en Planelles *et al.* (2001. *Infection and Immunity*. 69(10):6558-6563). Brevemente, ratones transgénicos A2/K<sup>b</sup> fueron inmunizados con los genes codificantes para las proteínas PFR2 y PFR3, en forma aislada asociada a la HSP70 (PFR2-HSP70 y PFR3-HSP70), respectivamente. Esplenocitos procedentes de estos ratones inmunizados se utilizaron en un ensayo de liberación de cromo como células efectoras, enfrentándolos a células EL4-A2/K<sup>b</sup> previamente pulsadas con cada uno de los péptidos PFR2<sub>19-28</sub> (SEQ ID NO 1), PFR2<sub>156-163</sub> (SEQ ID NO 2), PFR2<sub>449-457</sub> (SEQ ID NO 3), PFR3<sub>428-436</sub> (SEQ ID NO 4), PFR3<sub>475-482</sub> (SEQ ID NO 5) y PFR3<sub>481-489</sub> (SEQ ID NO 6) (5 µM) y marcadas con Cr<sup>51</sup>, funcionando éstas como células presentadoras de antígeno y células diana del ensayo. Como control negativo de este ensayo se emplearon células EL4-A2/K<sup>b</sup> marcadas con el isótopo pero no pulsadas con péptido. La cuantificación del cromo en el sobrenadante del pocillo en el que se enfrentaron las células efectoras y las presentadoras/diana, permitió analizar la capacidad citotóxica en respuesta a cada uno de los péptidos en los esplenocitos de los ratones inmunizados (Tabla 2). En la Tabla 2, se observa que los tres péptidos contenidos en la proteína PFR3 (PFR3<sub>428-436</sub>, PFR3<sub>475-482</sub> y PFR3<sub>481-489</sub>) son reconocidos por los esplenocitos de los ratones inmunizados con PFR3-HSP70 principalmente el péptido PFR3<sub>481-489</sub> que presenta el mayor porcentaje de lisis sobre las células diana. Por otro lado, para los péptidos contenidos en la PFR2 se evidencia la presencia de un epítipo altamente inmunodominante (PFR2<sub>449-457</sub>) capaz de inducir un muy alto porcentaje de lisis específica (Tabla 2). Ninguno de los seis péptidos fue reconocido por los esplenocitos de los ratones inoculados con PBS o plásmido vacío. Estos resultados muestran como dos de los seis epítipos ensayados (PFR2<sub>449-457</sub> y el PFR3<sub>481-489</sub>) son altamente inmunogénicos e inmunodominantes.

25

Tabla 2.- Capacidad de los péptidos de la invención de inducir una respuesta citotóxica específica.

Células EL4-A2Kb pulsadas con péptidos	Porcentaje de lisis específica (EL4-A2K <sup>b</sup> pulsadas - EL4-A2K <sup>b</sup> no pulsadas)	
	Ratones Inmunizados con PFR3-HSP70	Ratones Inmunizados con PFR2-HSP70
PFR2 <sub>19-28</sub>	ND	0
PFR2 <sub>156-163</sub>	ND	0
PFR2 <sub>449-457</sub>	ND	24
PFR3 <sub>428-436</sub>	7	ND
PFR3 <sub>475-482</sub>	7	ND
PFR3 <sub>481-489</sub>	12	ND

ND: no determinado

**EJEMPLO 3. Reconocimiento de epítomos contenidos en antígenos de *T. cruzi* por células mononucleares de pacientes con enfermedad de Chagas.**Determinación de Granzima B (GzB).

5

10

15

20

25

Para analizar la funcionalidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos se llevaron a cabo ensayos para determinar la producción de GzB, tal y como se describe en Maraño *et al.*, 2011. *Microbes and Infection* 12-13:1025-32. Brevemente, las células mononucleares circulantes (PBMC) de cada paciente fueron obtenidas a partir de 30 mL de sangre extraída por punción venosa y con anticoagulante (EDTA). En estas células fue determinada la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos que secretan granzima B mediante el sistema ELISPOT, empleando anticuerpos de la casa comercial MABTECH, para los cuales se siguió el siguiente protocolo: Las placas fueron fijadas con el anticuerpo de captura a una concentración final de 5 µg/mL. Tras incubar toda la noche a 4°C y bloquear con medio RPMI durante 30 min, se agregaron 5x10<sup>4</sup> PBMC por triplicado, seguido de cada uno de los siguientes péptidos: PFR2<sub>19-28</sub> (SEQ ID NO 1), PFR2<sub>156-163</sub> (SEQ ID NO 2) y PFR2<sub>449-457</sub> (SEQ ID NO 3), PFR3<sub>428-436</sub> (SEQ ID NO 4), PFR3<sub>475-482</sub> (SEQ ID NO 5) y PFR3<sub>481-489</sub> (SEQ ID NO 6) a una concentración final de 1 µM con un volumen final por pocillo de 200 µL. Como control positivo las PBMC se estimularon con PHA (10 µg/mL). Tras incubar 30 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, se recogió el sobrenadante en cada uno de los pocillos, procediéndose a congelarlo alicuoteado para la posterior determinación del perfil de GzB en dichas muestras. Se agregaron 100 µL/pocillo del anticuerpo de detección biotinilado a una concentración de 1 µg/mL, incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100 µL/pocillo del conjugado enzimático estreptavidina-ALP (Sigma) a una dilución 1/6000. Tras 1 hora a temperatura ambiente, se agregaron 50 µL/pocillo de la solución del sustrato (BCIP/NBT liquid, Sigma), deteniéndose la reacción una vez se considere la coloración adecuada de los puntos. Cada punto se corresponde a una célula productora de GzB. La cuantificación de los puntos obtenidos se determinó en un microscopio AXIO PLAN 2 Imagine, empleando KS ELISPOT para el análisis de los resultados.

Determinación de citocinas mediante ensayos Bio-plex.

30

35

El perfil de las citocinas (INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) fue determinado en el sobrenadante de las células post estimulación para el ensayo de ELISPOT descrito en el párrafo anterior empleando el kit comercial BIO-PLEX Cytokine Assay (Bio-Rad), para el cual se siguió el protocolo recomendado por el fabricante: Se colocaron las esferas magnéticas unidas a los anticuerpos de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , posteriormente se añadieron tanto las muestras a analizar como los estándares en cada uno de los pocillos. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió el cóctel de anticuerpos de detección. Se agregó la solución Streptavidina-PE, para finalmente proceder a la lectura empleando el equipo BIO PLEX 200 System y el programa Bio-Plex Manager 4.11 (Bio-Rad) para el análisis de los resultados obtenidos.

40

En las Tablas 3 y 4 aparecen los resultados de la detección del perfil de secreción de citocinas y producción de Granzima B en células mononucleares de pacientes HLA-A \*02:01<sup>+</sup> con enfermedad de Chagas y donantes sanos HLA-A \*02:01<sup>+</sup> en respuesta a epítomos contenidos en la proteína PFR2 (Tabla 3) y en respuesta a epítomos contenidos en la proteína PFR3 (Tabla 4).

45

<sup>a</sup> Fases de la enfermedad de Chagas: IND (pacientes infectados con *T. cruzi* en fase crónica no sintomática), CCC (pacientes infectados con *T. cruzi* en fase crónica que presentan patologías cardíacas. I, II y III indican el grado de patología cardíaca ascendente), HD (donantes sanos).

<sup>b</sup> Los valores positivos se indican en negrita y cursiva, usando como criterio de positividad que la concentración de citocina obtenida tras la estimulación con cada uno de los péptidos sea al menos de 5 pg/mL y tres veces mayor que los valores detectados en condiciones basales (células no estimuladas).

5 <sup>c</sup> Los valores positivos se indican en negrita y cursiva, usando como criterio de positividad que el número de células formadoras de puntos (SFC) obtenida tras la estimulación con cada uno de los péptidos sea al menos de 50 SFC por  $1 \times 10^6$  PBMC y dos veces mayor que los valores detectados en condiciones basales (células no estimuladas).

Tabla 3.- Detección del perfil de secreción de citocinas y de la producción de Granzima B en células estimuladas con epítomos contenidos en PFR2.

Péptido	Fase clínica <sup>a</sup>	Paciente	IFN- $\gamma$ (pg/mL) <sup>b</sup>	TNF- $\alpha$	GzB <sup>c</sup> (SCF/ $10^6$ PBMC)
PFR2 <sub>19-28</sub>	HD	499664	-3	0	0
	HD	411340	0	2	0
	IND	411535	-1	-2	<b>113</b>
	IND	411510	<b>5</b>	7	27
	IND	411119	1	1	<b>107</b>
	CCC I	411884	0	0	0
	CCC I	499770	0	-7	-7
PFR2 <sub>156-163</sub>	HD	499664	-3	0	0
	HD	Gr-011	0	-7	-13
	IND	411535	-1	0	<b>73</b>
	IND	411562	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>347</b>
	IND	411265	<b>166</b>	<b>149</b>	-20
	IND	411283	<b>27</b>	<b>42</b>	<b>240</b>
	CCC I	411456	3	7	40
	CCC I	411797	<b>10</b>	3	27
CCC I	411799	<b>9</b>	<b>8</b>	-13	
PFR2 <sub>449-457</sub>	HD	499664	-3	0	0
	HD	Gr-011	0	-8	-20
	IND	411535	-1	-1	<b>80</b>
	IND	411388	<b>7</b>	-8	0
	IND	411562	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>437</b>
	IND	411265	<b>158</b>	<b>181</b>	-13
	IND	411283	<b>20</b>	<b>43</b>	<b>80</b>

Tabla 4.- Detección del perfil de secreción de citocinas y de la producción de Granzima B en células estimuladas con epítomos contenidos en PFR3.

Péptido	Fase clínica <sup>a</sup>	Paciente	IFN- $\gamma$ (pg/mL) <sup>b</sup>	TNF- $\alpha$	GzB <sup>c</sup> (SCF/10 <sup>6</sup> PBMC)
PFR3 <sub>428-436</sub>	HD	499664	-3	0	7
	HD	Gr-011	0	-8	-13
	IND	499588	9	0	0
	IND	411265	190	66	-120
	IND	411283	21	28	160
	CCC I	411456	7	10	7
	CCC I	411797	8	3	27
	CCC I	411799	50	56	20
PFR3 <sub>475-482</sub>	HD	499664	-3	0	0
	HD	411340	0	-4	0
	IND	411388	7	1	7
	IND	411365	3	28	7
	IND	411917	3	-2	20
	CCC I	411884	0	0	20
	CCC I	499770	0	-7	-7
PFR3 <sub>481-489</sub>	HD	499664	-3	0	0
	HD	Gr-011	0	-7	-13
	IND	411388	7	-4	13
	IND	411265	238	240	-80
	IND	411283	17	28	153
	CCC I	411456	7	5	0
	CCC I	411797	15	7	13
	CCC I	411799	28	23	-13

**EJEMPLO 4. Caracterización de linfocitos T CD8+ específicos de epítomos contenidos en antígenos de T. cruzi y correspondientes a los péptidos de la invención en células mononucleares de pacientes con enfermedad de Chagas.**

Para llevar a cabo este ejemplo se procedió siguiendo el método descrito en Holst *et al.* (2011, J. Immunol. 186: 3994-4007). Brevemente, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> péptido-específicos fueron caracterizados empleando dextrámeros HLA-A\*02:01 unidos a los péptidos PFR2<sub>156-163</sub> (Fig. 1), PFR2<sub>449-457</sub> (Fig. 2) y PFR3<sub>428-436</sub> (Fig. 3) acoplados a un fluorocromo. Así mismo, fue utilizado un anticuerpo anti-CD8 para seleccionar esta población linfocitaria. Las células mononucleares aisladas antes del tratamiento (pre-) y 4 meses después del tratamiento (post-) son incubadas con el dextrámero de los péptidos PFR2<sub>156-163</sub> (Fig. 1), PFR2<sub>449-457</sub> (Fig. 2) y PFR3<sub>428-436</sub> (Fig. 3) en las condiciones óptimas previamente establecidas (Holst *et al.* (2011, J. Immunol. 186: 3994-4007). Tras este periodo de incubación se le añade el anticuerpo anti-CD8+ unido a un fluoróforo (de espectro diferencial al que porta el dextrámero) durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Seguidamente es lavado con PBS, al menos dos veces con PBS 1X-suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivado. Finalmente, las muestras se procesan por citometría. Los resultados del marcaje fueron obtenidos empleando un citómetro de flujo FACS Aria III Cell Sorter. Para el análisis de dichos datos fue utilizado el programa Flowjo 7.6.5. En las figuras se muestra un Plot con el nivel de linfocitos T CD8<sup>+</sup> frente al dextrámero de PFR2<sub>156-163</sub> (Fig. 1), PFR2<sub>449-457</sub> (Fig. 2) y PFR3<sub>428-436</sub> (Fig. 3). La población positiva para ambos marcadores (dextrámero y CD8) corresponde al cuadrante superior derecho. Como se muestra en las figuras, hay un incremento del porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> funcionales tras el tratamiento con Benznidazol.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Péptido caracterizado porque su secuencia aminoacídica se selecciona del grupo formado por la secuencia SEQ ID NO 3 de la proteína paraflagelar PFR2 de *Trypanosoma cruzi* y las secuencias que comparten al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 3.
- 2.- Péptido según la reivindicación 1 cuya secuencia aminoacídica es la secuencia SEQ ID NO 3.
- 10 3.- Molécula quimérica formada por la unión de uno o varios péptidos según la reivindicación 1 ó 2 y una o varias secuencias espaciadoras.
- 4.- Molécula quimérica según la reivindicación 3, que además comprende uno o varios adyuvantes y/o uno o varios fragmentos proteicos con o sin capacidad inmunogénica.
- 15 5.- Molécula quimérica según la reivindicación 3 ó 4 que comprende además, uno o varios péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 y los péptidos cuyas secuencias comparten al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.
- 20 6.- Molécula quimérica según la reivindicación 3 ó 4 que comprende además al menos un péptido de secuencia SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 o un péptido cuya secuencia comparte al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 o SEQ ID NO 6.
- 25 7.- Molécula quimérica, según la reivindicación 6, formada por la unión de la secuencia SEQ ID NO 3 o una secuencia con al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 3 y la secuencia SEQ ID NO 6 o una secuencia con al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 6.
- 30 8.- Molécula quimérica según la reivindicación 7, que además comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 o una secuencia con al menos un 80% de homología con la secuencia SEQ ID NO 1.
- 35 9.- Molécula de ADN que codifica un péptido según la reivindicación 1 ó 2, o una molécula quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.
- 10.- Vector que comprende una molécula de ADN según la reivindicación 9.
- 40 11.- Célula transformada con un vector según la reivindicación 10.
- 12.- Uso de un péptido según la reivindicación 1 ó 2, de una molécula quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, o de una molécula de ADN según la reivindicación 9, como biomarcador para la identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica y para la evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas.
- 45 13.- Composición farmacéutica que comprende uno o varios péptidos según la reivindicación 1 ó 2, y/o una o varias moléculas quiméricas según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, y/o una o varias moléculas de ADN según la reivindicación 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 14.- Composición farmacéutica según la reivindicación anterior que comprende además otro principio activo o medicamento quimioterapéutico y/u otras moléculas inmunoterapéuticas.
- 55 15.- Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 13 ó 14, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sola o en combinación con otras moléculas inmunoterapéuticas o medicamentos quimioterapéuticos.
- 60 16.- Método de identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica que comprende:
- a) incubar uno o varios péptidos según la reivindicación 1 ó 2, y/o una o varias moléculas quiméricas según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con enfermedad de Chagas, y
  - b) medir la concentración de citocinas proinflamatorias y el nivel de actividad citotóxica en dicha muestra,

donde una mayor concentración de citocinas proinflamatorias y la presencia de células con actividad citotóxica péptido-específica, frente a los valores detectados en células del mismo paciente no estimuladas, se asocia con la fase crónica indeterminada de la enfermedad.

5 17.- Método, según la reivindicación 16, donde la concentración de citocinas proinflamatorias se determina mediante un ensayo multiplex y la actividad citotóxica mediante un ensayo ELISPOT para la determinación de Granzima B.

10 18.- Método para la evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas que comprende las siguientes etapas:

A) incubar uno o varios péptidos según la reivindicación 1 ó 2, y/o una o varias moléculas quiméricas según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas pre-tratamiento y con una muestra de células mononucleares aisladas de un individuo con la enfermedad de Chagas post-tratamiento, y

15 B) medir el nivel de linfocitos T CD8+ péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra pre-tratamiento y en la muestra post-tratamiento, donde un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ péptido-específicos y/o molécula quimérica-específicos en la muestra post-tratamiento que en la muestra pre-tratamiento se asocia con la efectividad del tratamiento recibido.

20 19.- Kit que comprende un péptido según la reivindicación 1 ó 2, una molécula quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, y/o una molécula de ADN según la reivindicación 9, para llevar a cabo un método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.

25 20.- Uso del kit según la reivindicación 19 para la identificación de la fase de la patología de la enfermedad de Chagas en su fase crónica y/o para la evaluación del impacto terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Chagas.



PFR2 156-163

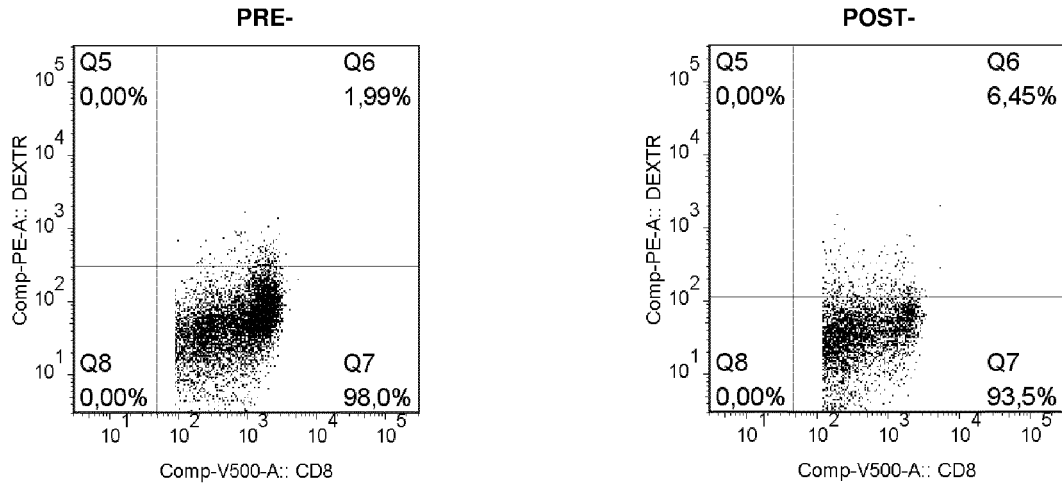


FIG. 1

PFR2 449-457

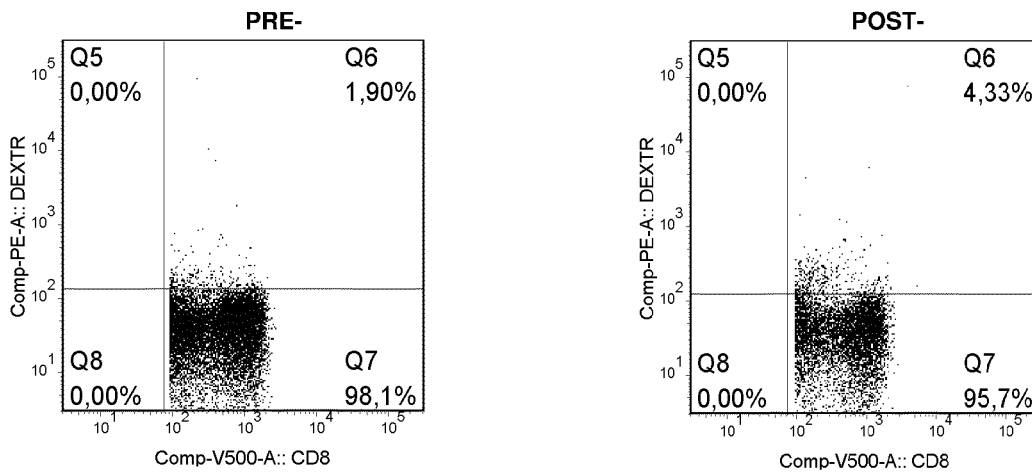


FIG. 2

PFR3 428-436

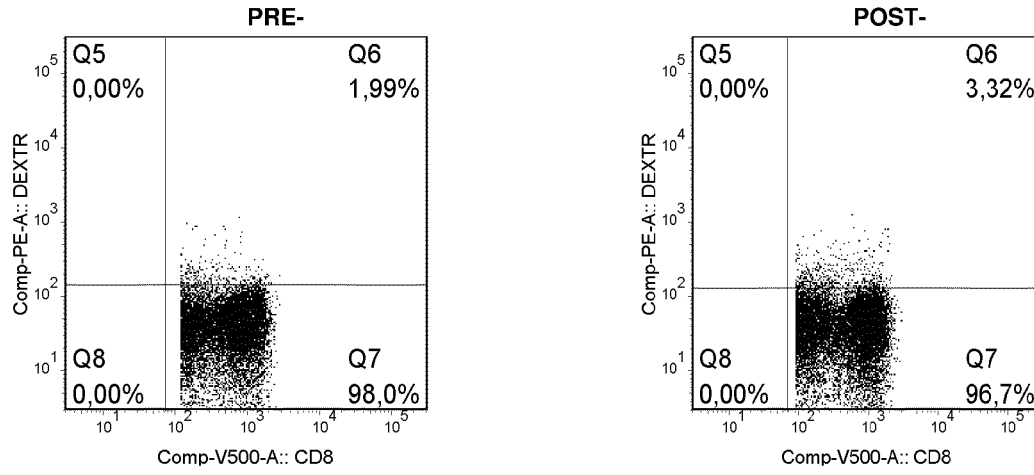


FIG. 3

Listado de Secuencias

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> Biomarcadores de la enfermedad de Chagas

<130> 097/12

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Péptido PFR2 19-28

<400> 1

Ala Val Pro Glu Val Thr Asp Val Thr Leu  
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Péptido PFR2 156-163

<400> 2

Lys Leu Glu Lys Ile Glu Asp Glu Leu  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Péptido PFR2 449-457

<400> 3

Arg Leu Tyr Lys Thr Leu Gly Gln Leu  
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Péptido PFR3 428-436

<400> 4

Phe Val ser Cys Cys Gly Glu Leu Thr Val  
1 5 10

<210> 5

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Péptido PFR3 475-482

<400> 5

Asp Ile Ile Glu Gln Met Lys Gly Val  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Péptido PFR3 481-489

<400> 6

Gly Val ser Gly Val Ile Asn Ala Leu  
1 5



- ②① N.º solicitud: 201230846  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.06.2012  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K39/005** (2006.01)  
**A61P33/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	THOMAS M.C et al. Identificación de epítopes CTL en las proteínas paraflagelares de <i>Trypanosoma cruzi</i> . VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI), Salamanca 2-5 marzo 2010, Póster nº 25, páginas 1-7, [recuperado el 25.11.2013]. Recuperado de Internet: URL: < <a href="http://www.fundacion.usal.es/semtsi/index.php/component/flippingbook/book/28-poster_2/2-semtsi?tmpl=component">http://www.fundacion.usal.es/semtsi/index.php/component/flippingbook/book/28-poster_2/2-semtsi?tmpl=component</a> >, todo el documento	1-20
A	WRIGHTSMAN R.A et al. Paraflagellar rod protein-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes target <i>Trypanosoma cruzi</i> -infected host cells. <i>Parasite Immunology</i> , 2002, vol. 24, páginas 401-412, todo el documento.	1-20
A	PADILLA et al. CD8+ T cells in <i>Trypanosoma cruzi</i> infection. <i>Current Opinion in Immunology</i> , PMC (NIH Public Access), 2010 [online], páginas 1-9, [recuperado el 25/11/2013]. Recuperado de Internet: URL: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735075/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735075/</a> >, todo el documento.	1-20
A	MIYAHIRA Y. <i>Trypanosoma cruzi</i> infection from the view of CD8+ T cell immunity-An infection model for developing T cell vaccine. <i>Parasitology International</i> , 2008, vol. 57, páginas 38-48, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
25.11.2013

**Examinador**  
J. Collado Martínez

**Página**  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, EMBL-EBI, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.11.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-20	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	THOMAS M.C et al. VII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI), Salamanca 2-5 marzo 2010, Póster nº 25, páginas 1-7.	2010
D02	WRIGHTSMAN R.A et al. Parasite Immunology, 2002, vol. 24, páginas 401-412, todo el documento.	2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud tiene por objeto epítomos peptídicos contenidos en las proteínas PFR (paraflagellar rod protein) 2 y 3 de *Trypanosoma cruzi* y/o moléculas quiméricas que los comprenden, que son capaces de provocar una respuesta específica por parte de linfocitos T citotóxicos (CTL). Se refiere asimismo a composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas que comprenden los péptidos y/o moléculas quiméricas de la invención, y al uso de los péptidos y/o moléculas quiméricas como biomarcadores para la identificación del estadio de la enfermedad de Chagas en su fase crónica y para la evaluación de la eficacia de un tratamiento.

El documento D01 divulga la Identificación de epítomos de las proteínas PFR2 y PFR3 de *T. cruzi* con motivos de unión a HLA-A\*0201, así como un estudio de la actividad citotóxica específica de linfocitos T frente a dichos péptidos en ratones, y de la actividad citotóxica y la producción de citocinas en pacientes chagásicos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un análisis de la respuesta de linfocitos T citotóxicos generada frente a péptidos contenidos en las proteínas PFR de *T. cruzi* y que presentan motivos teóricos de unión a MHC (Major Histocompatibility Complex) Clase I H-2b (ver todo el documento).

El documento D03 tiene por objeto un estudio de la variación que experimenta la población de células T CD8+específicas para *T. cruzi* a lo largo de las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, así como tras un tratamiento quimioterapéutico, proporcionando este último análisis una posible herramienta de medida para determinar la eficacia de dicho tratamiento (ver todo el documento).

El documento D04 se refiere al estudio de la infección por *T. cruzi* como modelo para el desarrollo de vacunas basadas en la respuesta mediada por células T CD8+ contra agentes infecciosos intracelulares. En particular, divulga epítomos derivados de diferentes antígenos de *T. cruzi* que son inductores de la proliferación de células T CD8+ en ratones (ver todo el documento).

NOVEDAD (art. 6.1, LP 11/1986)

Reivindicaciones 1-20

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la presente solicitud es D01. Dicho documento divulga epítomos CTL con motivos de unión a la molécula HLA-A\*0201 que están contenidos en las proteínas PFR2 y PFR3 de *T. cruzi*. En particular, se trata de seis péptidos que presentan un grado variable de afinidad y estabilidad de unión a la molécula HLA-A\*0201. Además, dos de estos péptidos, 12807 de PFR2 y 18420 de PFR3, son capaces de inducir una respuesta citotóxica específica en ratones A2/Kb inmunizados, con porcentajes de lisis específica, que según se observa en las gráficas de la página 5 de D01, serían equivalentes a los porcentajes de lisis específica obtenidos para los péptidos de SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 6 de la solicitud (Tabla 2, página 12). Por otra parte, al igual que los péptidos de la invención, los de D01 son capaces de inducir en pacientes con enfermedad de Chagas una respuesta citotóxica y secreción de citocinas.

Sin embargo, a pesar de la analogía apreciable entre las propiedades inmunológicas de los péptidos de D01 y los de la presente solicitud, el documento D01 no revela la secuencia particular de los seis péptidos objeto de estudio. Por lo tanto, no divulga de forma idéntica los productos objeto de las reivindicaciones 1-11, 13-14 y 19, ni consecuentemente los usos y métodos objeto de las reivindicaciones 12, 15-18 y 20.

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1-20 cumple el requisito de novedad establecido en el art. 6.1 de la LP 11/86.



## ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986)

## Reivindicaciones 1-20

Como ya se ha indicado, la diferencia fundamental entre D01 y el objeto de la presente solicitud estriba en que D01 no divulga las secuencias de los péptidos analizados, si bien indica que dichos péptidos constituyen epítomos contenidos en las proteínas PFR2 y PFR3 de *T. cruzi* y que dos de estos epítomos son capaces de generar una respuesta CTL específica aparentemente igual a la producida por los péptidos de SEQ ID NO 3 y 6 de la presente solicitud. Por otra parte, el documento D02 divulga epítomos de PFR de *T. cruzi*, y en particular uno contenido en PFR1 que presenta cierto grado de similitud (78%) con la SEQ ID NO 6 de la solicitud, pero que no induce una respuesta CTL específica.

El problema técnico que subyace en la presente solicitud consiste en la falta de epítomos y determinantes antigénicos que, por una parte sean capaces de inducir una respuesta CTL antígeno específica que permita controlar la infección por *T. cruzi*, y por otra puedan ser empleados como biomarcadores fiables para determinar la fase de la enfermedad en su fase crónica y para evaluar el impacto terapéutico de un tratamiento.

La determinación por parte de los inventores de secuencias peptídicas definidas correspondientes a epítomos de PFR2 y PFR3 respectivamente, capaces de producir una respuesta CTL específica tiene como efecto técnico precisamente proporcionar los determinantes antigénicos y biomarcadores que potencialmente resuelven el problema planteado. Por otra parte, a la luz de la descripción y del estado de la técnica, se puede afirmar que dicha determinación no podría haber sido llevada a cabo meramente empleando las herramientas predictivas disponibles en el campo técnico de la invención, sino que requiere de la investigación de las propiedades inmunológicas particulares de los péptidos. Por ello, se considera que para un experto en la materia no resultaría obvio llegar a los péptidos y moléculas quiméricas de la invención y a su uso como biomarcadores de la enfermedad de Chagas y para fabricar vacunas útiles en el tratamiento de dicha enfermedad a la vista simplemente de lo divulgado en D01 y D02, tomados estos de forma independiente o combinada.

En consecuencia el objeto de las reivindicaciones 1-20 satisface el requisito de actividad inventiva del art. 8.1 de la LP 11/1986.