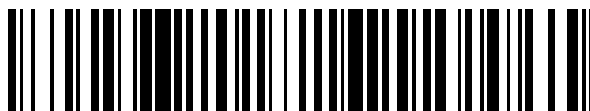


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 026**

51 Int. Cl.:

C07K 16/20 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 08868099 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2238167**

54 Título: **Anticuerpos anti-T. cruzi y métodos de uso**

30 Prioridad:

27.12.2007 US 17071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2015

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US

72 Inventor/es:

BROPHY, SUSAN E.;
HAWKSWORTH, DAVID J.;
SHAH, DINESH O.;
SIEGEL, ROBERT W.;
TIEMAN, BRYAN C.;
TU, BAILIN;
ZIEMANN, ROBERT N. y
TYNER, JOAN D.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 539 026 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-*T. cruzi* y métodos de uso

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a métodos, análisis y kits para detectar o cuantificar antígenos de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*.

10 Antecedentes

El parásito *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* causa la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) y es endémica en América Central y del Sur, así como en México. Después de una fase aguda leve, las víctimas más infectadas entran en una fase indeterminada que se caracteriza por una falta de síntomas, bajo recuento de parásitos, y bajos títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Aproximadamente 10-30% de las personas con infecciones crónicas por *T. cruzi*, desarrollan disfunción cardíaca o gastrointestinal. La quimioterapia puede curar a un número sustancial de bebés y niños infectados congénitamente, pero es en gran medida ineficaz en adultos que albergan infecciones crónicas (Coura, J. y S. de Castro, 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97:3-24). Aproximadamente 25.000 de los aproximadamente 12 millones de personas en los países endémicos que están infectadas crónicamente con *T. cruzi* mueren de la enfermedad cada año, debido a alteraciones del ritmo cardíaco o insuficiencia cardíaca congestiva (Kirchhoff, L.V. 2006. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In Tropical Infections Diseases: Principles, Pathogens and Practice. Vol. R. Guerrant, D. Walker, y P. Weller, editors. Churchill Livingstone, Nueva York. 1082-1094).

El Chagas recibió el nombre del médico brasileño Carlos Chagas, quien lo describió por primera vez en 1909 (Chagas, C. 1909A. Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung. Arch. Schiff. Tropenhyg. 13: 120-122; Redhead, S. A., et al. 2006. Pneumocystis y Trypanosoma cruzi: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol. 53: 2-11). Descubrió que los intestinos de *Triatomidae* albergaban un protozoo flagelado, una nueva especie del género *Trypanosoma*, y fue capaz de demostrar experimentalmente que el parásito podría transmitirse a los monos títi que eran picados por el insecto infectado. Chagas denominó el parásito patógeno que causa la enfermedad *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909A) y más tarde ese año *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, C. 1909b. Nova tripanozomiasis humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidades morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1: 159-218), ambos nombres en honor a Oswaldo Cruz, un médico brasileño y epidemiólogo que luchó contra epidemias de fiebre amarilla, viruela y peste bubónica a comienzos del siglo XX.

Charles Darwin pudo haber padecido esta enfermedad como resultado de una mordedura del "Gran Chinche Negro de las Pampas" que recibió al este de los Andes cerca de Mendoza. Darwin informó del episodio en sus diarios de la *Viaje del Beagle*. Darwin era joven y de buena salud en general, aunque seis meses antes había estado enfermo durante un mes cerca de Valparaíso, pero en 1837, casi un año después de su regreso a Inglaterra, comenzó a sufrir de forma intermitente desde un extraño grupo de síntomas, quedando incapacitado durante gran parte del resto de su vida.

En las zonas endémicas, *T. cruzi* es transmitido principalmente por insectos triatómidos hematófagos. La enfermedad también se puede transmitir por transfusión de sangre, uso de drogas intravenosas, transmisión congénita, por la actividad sexual, el trasplante de órganos o por medio de la leche materna (Bittencourt, A. L. 1976. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child. 130:97-103; Cheng, K.Y., et al. 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to Trypanosoma cruzi. Clin Vaccine Immunol. 14:355-61; Grant, I. H., et al. 1989. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. Ann Intern Med. 111:849-51; Hoff, R., et al. 1978. Congenital Chagas's disease in an urban population: investigation of infected twins. Trans R Soc Trop Med Hyg. 72:247-50; Kirchhoff, L.V. 1989. Is Trypanosoma cruzi a new threat to our blood supply? Ann Intern Med. 111:773-5; Skolnick, A. 1989. Does influx from endemic areas mean more transfusion-associated Chagas' disease? Jama. 262:1433). Actualmente, no existe una vacuna contra *T. cruzi*.

El diagnóstico de la infección crónica por *T. cruzi* refleja la complejidad del ciclo de vida del parásito. Durante los períodos de fiebre alta, diagnóstico consiste simplemente en la identificación de los parásitos en la sangre, líquido cefalorraquídeo, tejido fijado o ganglios linfáticos; sin embargo, durante las fases de latencia y crónicas de la infección, el virus es difícil de detectar. En el xenodiagnóstico, el contenido intestinal de los insectos vectores se examina para determinar *T. cruzi* varias semanas después de que estos parásitos se alimenten de la sangre de un paciente sospechoso. Sin embargo, este procedimiento es laborioso, costoso y carece de sensibilidad (Segura, E. 1987. Xenodiagnosis. In Chagas' Disease Vectors. Vol. R.R. Brenner and A. M. Stoka, editors. CRC Press, Boca Raton, FL. 41-45).

Por el contrario, los análisis serológicos para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* son muy adecuados para el diagnóstico rápido y económico de la infección. Estos métodos incluyen inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, fijación del complemento e inmunoanálisis enzimático (Cheng, K.Y., et al. 2007, Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to Trypanosoma cruzi. Clin Vaccine Immunol. 14:355-61). Un problema persistente con análisis convencionales ha sido la aparición de resultados no concluyentes y falsos positivos (Almeida, I.C., et al. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active Trypanosoma cruzi infection. Transfusion. 37:850-7; (Kirchhoff et al., 2006; Leiby, D.A., et al. 2000. Serologic testing for Trypanosoma cruzi: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits, J Clin Microbiol. 38:639-42).

Ningún análisis ha sido aceptado de manera uniforme como el diagnóstico serológico convencional con oro de la infección por *T. cruzi* (Cheng et al., 2007). Se ha encontrado que los análisis que se han diseñado para detectar ADN de *T. cruzi* son insensibles (Gomes, M.L., et al. 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods, Am J Trop Med Hyg. 60:205-10). Un análisis de precipitación radioinmune (RIPA) que produce resultados fácilmente interpretados fue desarrollado hace casi dos décadas y se ha sugerido para su uso como prueba de confirmación en los Estados Unidos (Kirchhoff et al., 1989). Su sensibilidad y especificidad, sin embargo, no se han validado sistemáticamente. Por otra parte, la complejidad del RIPA hace difícil su uso generalizado fuera de los entornos de investigación (Leiby et al., 2000).

Quaissi A, et al, Biol.Cell (1992) 75, 11-17 describen un anticuerpo monoclonal reactivo con un antígeno específico de *T. cruzi* de 24-kDa que es una proteína de unión a calcio flagelar indicada como útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Los inmunoanálisis diseñados para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en muestras de pacientes pueden proporcionar métodos de diagnóstico serológicos rápidos y fiables. Típicamente, este tipo de kits de diagnóstico utilizan uno o más anticuerpos específicos para actuar como calibradores, controles positivos y/o miembros del panel. A menudo, el plasma y/o suero humano con alto título de Chagas se escruta y se incorpora al reactivo de control negativo a cantidades específicas. Los reactivos de control de calidad de Chagas, tales como controles positivos, son muestras de plasma o suero humanos escrutados para detectar la presencia de anticuerpos contra epítopos específicos. Sin embargo, el uso de muestras de suero y plasma humanos tiene varias desventajas significativas. Estas incluyen: (1) el aumento de problemas normativos, (2) la dificultad en la obtención de gran volumen con alto título y especificidad; (3) la variabilidad de los lotes; (4) las limitaciones en cuanto a la caracterización; y (5) el coste.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de anticuerpos específicos para actuar como calibradores, controles positivos y/o los miembros de panel. La presente descripción opcionalmente supera o evita algunos de los problemas de los inmunoanálisis actuales de *T. cruzi* (a saber, el aumento de problemas normativos, la dificultad en la obtención de gran volumen con alto título y especificidad, mucha variabilidad, limitaciones en cuanto a la caracterización, y coste) proporcionando nuevos anticuerpos, líneas celulares que producen estos anticuerpos, y métodos de fabricación de estos anticuerpos.

Compendio

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona primero un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de *T. cruzi*, en donde dichos uno o más anticuerpos son específicos para el polipéptido FP3 de *T. cruzi* del SEQ ID NO: 2, y en donde dichos uno o más anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en:

- (i) un anticuerpo quimérico que tiene una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 12 y que tiene una región V_L , que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 10;
- (ii) el anticuerpo quimérico expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana (Colección Americana de Tejidos Tipo) con el Número de Acceso PTA-8136; y
- (iii) el anticuerpo expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8139.

En una realización, el reactivo de inmunodiagnóstico anterior comprende dos o más de dichos anticuerpos.

En el reactivo de inmunodiagnóstico anterior, dichos uno o más anticuerpos pueden tener al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

¹ y $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $8,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre $3,3 \times 10^{-12} \text{ M}$ y $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$.

5 El reactivo de inmunodiagnóstico anterior puede seleccionarse del grupo consistente en un reactivo de detección, un reactivo de normalización, y un reactivo de control positivo.

La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido FP3 de *T. cruzi* del SEQ ID NO: 2, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en

- 10 (i) un anticuerpo quimérico que tiene una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 12 y que tiene una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 10;
- (ii) el anticuerpo quimérico expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8136; y
- 15 (iii) el anticuerpo expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8139.

20 En una realización, el anticuerpo anterior tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a entre $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $8,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre $3,3 \times 10^{-12} \text{ M}$ y $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$.

25 La presente invención también proporciona una línea celular que expresa un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un polipéptido de *T. cruzi*, en donde la línea celular es una línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana y que tiene el Número de Acceso PTA-8136.

Además, la presente invención proporciona un método de normalización de un análisis de detección de *T. cruzi* que comprende utilizando el reactivo de inmunodiagnóstico anterior de la invención como un panel de sensibilidad.

30 La presente invención proporciona adicionalmente un método para detectar un antígeno de *T. cruzi* que comprende las etapas de:

- 35 (a) poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de contener un antígeno de *T. cruzi* con el reactivo de inmunodiagnóstico anterior de la invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo quimérico:antígeno; y
- (b) detectar complejos de anticuerpo quimérico:antígeno cualesquiera formados como una indicación de la presencia de dicho antígeno de *T. cruzi*.

40 En el último método, el anticuerpo quimérico puede comprender una etiqueta detectable, o los complejos de anticuerpo:antígeno se pueden poner en contacto con un anticuerpo secundario o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo comprende un marcador detectable.

Una realización adicional de la invención es un método para detectar un anticuerpo de *T. cruzi* que comprende las etapas de:

- 45 (1) poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de (que contiene anticuerpo de *T. cruzi* con un antígeno de *T. cruzi* específico para el anticuerpo de *T. cruzi* bajo condiciones que permiten la formación de complejos de antígeno:anticuerpo; y
- 50 (2) volver a someter a ensayo cualquier complejo de antígeno:anticuerpo formado como indicación de la presencia de dichos antígenos de *T. cruzi*, en donde el reactivo de inmunodiagnóstico anterior de la invención se usa en dicho método como control positivo o reactivo de normalización, y en donde el antígeno de *T. cruzi* es FP3.

55 La presente invención proporciona adicionalmente un kit de diagnóstico para la detección de *T. cruzi* que comprende el reactivo de inmunodiagnóstico anterior de la invención.

60 Además de la invención, la presente descripción se refiere a otros diversos aspectos de la descripción que, sin embargo, no son realizaciones de la intención. Tales aspectos adicionales que no entran dentro del alcance de la presente invención definido anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas se presentan con fines comparativos.

Un objeto de la descripción es proporcionar anticuerpos, incluyendo anticuerpos recombinantes y anticuerpos quiméricos, que se unen específicamente a antígenos de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y usos de los mismos.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporcionan anticuerpos recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, que son capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. Los anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo específico para polipéptidos de *T. cruzi* formado por FP3, Pep2, FP10 y la FRA.

En un aspecto de la descripción, el anticuerpo es dicho anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FRA y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $5,7 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,3 \times 10^{-7}\text{M}$;

(b) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es Pep2 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $6,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}\text{M}$;

(c) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP10 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: (a) una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; (B) una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; y (c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $1,6 \times 10^{-8}\text{M}$;

(d) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP3 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-12}\text{M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-9}\text{M}$; y

(e) cualquier combinación de (a)-(d).

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico expresado por una línea celular, en donde la línea celular se selecciona del grupo que consiste en PTA-8136, PTA-8138 y PTA-8140. Opcionalmente, el anticuerpo es expresado por una línea celular seleccionada del grupo que consiste en PTA-8137, PTA-8139, PTA-8141, y PTA-8142. Los anticuerpos opcionalmente son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de afinidad madurada, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro, y anticuerpos anti-idiotípicos, inmunoglobulinas de dominio variable dual (DVD-Ig®) o fragmentos de los mismos.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más de estos anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*, en donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en FP3, Pep2, FP10 y FRA.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FRA y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al último constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $5,7 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,3 \times 10^{-7}\text{M}$;

(b) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es Pep2 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $6,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ y una

constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $7,5 \times 10^{-10}M$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}M$;

(c) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP10 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: (a) una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $5,0 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$; (b) una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}s^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4}s^{-1}$; y (c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-10}M$ y aproximadamente $1,6 \times 10^{-8}M$;

(d) un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP3 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $2,0 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $6,0 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-5}s^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4}s^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-12}M$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-9}M$; y

(e) cualquier combinación de (a)-(d).

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, el reactivo de inmunodiagnóstico se selecciona del grupo que consiste en un reactivo de detección, un reactivo de normalización, y un reactivo de control positivo.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*, comprendiendo la región un epítipo abarcado por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, al menos 90% y al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se expone en el SEC ID NO.: 2, el SEQ ID NO.: 4, el SEQ ID NO.: 6 y el SEQ ID NO.: 8. De acuerdo con otro aspecto de la descripción, el reactivo de inmunodiagnóstico que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi* que comprende un anticuerpo quimérico, en donde el anticuerpo quimérico se une específicamente a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO.: 2, el SEQ ID NO.: 4, el SEQ ID NO.: 6 y el SEQ ID NO.: 8. Los anticuerpos opcionalmente son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de afinidad madurada, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro, y anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos. De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporciona un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende estos anticuerpos.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, y reactivos de inmunodiagnóstico que comprenden los anticuerpos, en donde los anticuerpos comprenden una región V_H seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO.: 10, el SEQ ID NO.: 14, el SEQ ID NO.: 18 y el SEQ ID NO.: 28.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, y reactivos de inmunodiagnóstico que comprenden los anticuerpos, en donde los anticuerpos comprenden una región V_L seleccionada del grupo que consiste en el SEQ ID NO.: 12, el SEQ ID NO.: 16, el SEQ ID NO.: 20 y el SEQ ID NO.: 26.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, y reactivos de inmunodiagnóstico que comprenden los anticuerpos, en donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo que comprende una región V_H sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 10 y una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 12; una región V_H sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 14 y una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 16; una región V_H sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 18 y una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 20; una región V_H sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 28 y una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 26. Los anticuerpos opcionalmente son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de afinidad madurada, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro, y anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporciona una línea celular capaz de expresar un anticuerpo quimérico que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*, en

donde la línea celular opcionalmente se selecciona del grupo que consiste en PTA-8136, PTA-8138 y PTA-8140. También se proporciona una línea celular que es capaz de expresar un anticuerpo que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*, donde la línea celular opcionalmente se selecciona del grupo que consiste en PTA-8137, PTA-8139, PTA-8141 y PTA-8142.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de normalización de un análisis de detección de *T. cruzi* que comprende usar como un panel de sensibilidad reactivo de inmunodiagnóstico que comprende opcionalmente uno o más anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. En tal panel, opcionalmente uno o más anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo específico para FP3, Pep2, FP10 y FRA.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para detectar la presencia de antígenos de *T. cruzi* que comprende poner en contacto una muestra de análisis, tal como una muestra sospechosa de contener antígenos de *T. cruzi*, con un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a un antígeno de *T. cruzi*. Opcionalmente, el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo:antígeno. Adicionalmente de manera opcional, el método comprende detectar cualquier complejo de anticuerpo:antígeno formado. Los anticuerpos opcionalmente son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de afinidad madurada, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro, y anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para detectar la presencia de anticuerpos de *T. cruzi* que comprende poner en contacto una muestra de análisis, tal como una muestra sospechosa de contener anticuerpos de *T. cruzi*, con uno o más antígenos específico para los anticuerpos de *T. cruzi*. Opcionalmente este contacto se realiza bajo condiciones que permiten la formación de complejos de antígeno:anticuerpo, y adicionalmente de manera opcional el método comprende detectar los complejos de antígeno:anticuerpo. También adicionalmente, el método comprende opcionalmente el uso de un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos y recombinantes, en donde cada uno de los anticuerpos es capaz de unirse específicamente a uno de los antígenos usados en el método, p. ej., ya sea como un control positivo o reactivo de normalización.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un kit de diagnóstico para la detección de *T. cruzi* que comprende un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos, incluyendo anticuerpos recombinantes y quiméricos recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. En un kit de este tipo, los uno o más anticuerpos opcionalmente se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo, incluyendo los anticuerpos quiméricos y recombinantes, específicos para FP3, Pep2, FP10 y FRA. Los anticuerpos opcionalmente son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de afinidad madurada, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro, y anticuerpos anti-idiotípicos, o fragmentos de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente descripción, se proporcionan polipéptidos aislados que comprenden una porción de un anticuerpo quimérico que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi* seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos de *T. cruzi* que comprenden polipéptidos FP3, PEP2, FP10 o FRA. El anticuerpo quimérico opcionalmente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO.: 2, el SEQ ID NO.: 4, el SEQ ID NO.: 6 y el SEQ ID NO.: 8. Los polipéptidos aislados comprenden opcionalmente una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 10, el SEQ ID NO.: 14 el SEQ ID NO.: 18, y el SEQ ID NO.: 28. Los polipéptidos aislados comprenden opcionalmente una región V_L seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 12, el SEQ ID NO.: 16, el SEQ ID NO.: 20 y el SEQ ID NO.: 26. Adicionalmente, los polipéptidos aislados comprenden una región tanto V_H como V_L seleccionadas del grupo que consiste en una región V_H del SEQ ID NO.: 10 y una región V_L del SEQ ID NO.: 12; una región V_H del SEQ ID NO.: 14 y una región V_L del SEQ ID NO.: 16; una región V_H del SEQ ID NO.: 18 y una región V_L del SEQ ID NO.: 20; y una región V_H del SEQ ID NO.: 28 y una región V_L del SEQ ID NO.: 26.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican una porción de un anticuerpo quimérico que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, el polipéptido de *T. cruzi* se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos de *T. cruzi* que comprenden polipéptidos FP3, PEP2, FP10 y FRA. El anticuerpo quimérico opcionalmente se selecciona del grupo

que consiste en un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO.: 2, el SEQ ID NO.: 4, el SEQ ID NO.: 6 y el SEQ ID NO.: 8. Los polinucleótidos aislados comprenden opcionalmente una región que codifica una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 10, el SEQ ID NO.: 14, el SEQ ID NO.: 18 y el SEQ ID NO.: 28. Los polinucleótidos aislados comprenden una región que codifica una región V_L seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en el SEQ ID NO.: 12, el SEQ ID NO.: 16, el SEQ ID NO.: 20 y el SEQ ID NO.: 26. Además, los polinucleótidos aislados comprenden una región que codifica una región tanto V_H como V_L seleccionada del grupo que consiste en una región V_H del SEQ ID NO.: 10 y una región V_L del SEQ ID NO.: 12; una región V_H del SEQ ID NO.: 14 y una región V_L del SEQ ID NO.: 16; una región V_H del SEQ ID NO.: 18 y una región V_L del SEQ ID NO.: 20; y una región V_H del SEQ ID NO.: 28 y una región V_L del SEQ ID NO.: 26. En otros aspectos, el polinucleótido es uno seleccionado del grupo que consiste en el SEQ ID NO.: 9, el SEQ ID NO.: 11, el SEQ ID NO.: 13, el SEQ ID NO.: 15, el SEQ ID NO.: 17, el SEQ ID NO.: 19, el SEQ ID NO.: 25 y el SEQ ID NO.: 27.

De acuerdo con otro aspecto más de la descripción, se proporciona métodos de purificación de un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de *T. cruzi* que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS.: 1, 3, 5 o 7, que comprende poner en contacto una muestra sospechosa de contener un polipéptido de *T. cruzi* con un reactivo de inmunodiagnóstico, comprendiendo el reactivo de inmunodiagnóstico uno o más anticuerpos, incluyendo anticuerpos quiméricos o recombinantes, que son capaces de unirse específicamente a una proteína de *T. cruzi*, en condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo:antígeno, aislando los complejos de anticuerpo:antígeno formados y separando el antígeno del anticuerpo. Opcionalmente, el anticuerpo, incluyendo los anticuerpos quiméricos y recombinantes, se une a un polipéptido de *T. cruzi* del grupo que consiste en FP3, Pep2, FP10, y FRA seleccionado.

Estas y otras características, aspectos, objetos y realizaciones de la descripción serán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos que son ilustrativos de tales características, aspectos, objetos y realizaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 presenta una estructura esquemática de los anticuerpos anti-epítipo de *T. cruzi* quimérico (ratón-humano) de la descripción.

La FIG. 2 representa esquemáticamente el plásmido Chagas 12-392-150 Mu-Hu_pBJ, tamaño de plásmido: 9520 nucleótidos. Un ORF del gen de resistencia a ampicilina se encuentra en las bases 60 a 917; un promotor se encuentra en las bases 1551-2021; un promotor se localiza en las bases 2023-2744; un péptido señal de la cadena pesada se localiza en las bases 2772-2828; un gen de V_H se localiza en las bases 2829-3194; una hgG1 constante humana, z, no a se localiza en las bases 3195-4187; un poli A de SV40 se localiza en las bases 4219-4413; un promotor de SV40 se localiza en las bases 4684-5229; un DHFR murino se localiza en las bases 5257-5820; un poli A de TK se localiza en las bases 5847-6213; un intensificador se localiza en las bases 6241-6711; un promotor se localiza en las bases 6712-7433; un péptido señal kappa se localiza en las bases 7460-7525; un gen de V_L se localiza en las bases 7526-7861; una cadena kappa constante humana se localiza en las bases 7862-8185; un poli A de SV40 se localiza en las bases 8198-8392; y un origen de pUC se localiza en las bases 8759-9432 (complementarias).

Las Figs. 3A-C representan la secuencia de polinucleótidos de doble cadena de anotada para las secuencias de V_H y V_L (y regiones flanqueantes) clonadas en Chagas 12-392-150 Mu-Hu_pBJ. La FIG. 3A-B representa la secuencia de polinucleótidos (SEQ ID NO.: 21-22) para el péptido señal de la cadena Pesada localizada en las bases 2772-2828, secuencias génicas de V_H localizadas en las bases 2829-3194, y secuencias de IgG1 constante humana, z, no a localizadas en las bases 3195-4187. La FIG. 3C representa la secuencia de polinucleótidos (SEQ ID NO.: 23-24) del péptido señal Kappa localizado en las bases 7460-7525, las secuencias génicas de V_L localizadas en las bases 7526-7861, y las secuencias de kappa Constante Humana localizadas en las bases 7862-8185.

La FIG. 4 representa esquemáticamente el plásmido Chagas 9-638 Mu-Hu_pBJ, tamaño del plásmido: 9514 nucleótidos. Un ORF gen de resistencia a ampicilina se localiza en las bases 60 a 917; un intensificador se localiza en las bases 1551-2021; un promotor se localiza en las bases 2023-2744; un péptido señal de la cadena pesada se localiza en las bases 2772-2828; un gen de V_H se localiza en las bases 2829-3188; una hgG1 humana constante, z, no a se localiza en las bases 3189-4181; una poli A de SV40 se localiza en las bases 4213-4407; un promotor de SV40 se localiza en las bases 4678-5223; un DHFR murino se localiza en las bases 5251-5814; una poli A de TK se localiza en las bases 5841-6207; un intensificador se localiza en las bases 6235-6705; un promotor se localiza en las bases 6706-7427; un péptido señal kappa se localiza en las bases 7454-7519; un gen de V_L se localiza en las bases 7520-7858; una cadena kappa constante humana se localiza en las bases 7859-8179; una poli A de SV40 se localiza en las bases 8192-8386; y un origen de pUC se localiza en las bases 8753-9426 (complementarias).

La FIG. 5 representa esquemáticamente el plásmido Chagas 10-745 Mu-Hu_pBJ, tamaño del plásmido: 9514 nucleótidos. Un ORF gen de resistencia a ampicilina se localiza en las bases 60 a 917; un intensificador se localiza

en las bases 1551-2021; un promotor se localiza en las bases 2023-2744; un péptido señal de la cadena pesada se localiza en las bases 2772-2828; un gen de V_H se localiza en las bases 2829-3188; una IgG1 constante humana, α , se localiza en las bases 3189-4181; una poli A de SV40 se localiza en las bases 4213-4407; un promotor de SV40 se localiza en las bases 4678-5223; un DHFR murino se localiza en las bases 5251-5814; una poli A de TK se localiza en las bases 5841-6207; un intensificador se localiza en las bases 6235-6705; un promotor se localiza en las bases 6706-7427; un péptido señal kappa se localiza en las bases 7454-7519; un gen de V_L se localiza en las bases 7520-7855; una cadena kappa constante humana se localiza en las bases 7856-8179; una poli A de SV40 se localiza en las bases 8192-8386; y un origen de pUC en las bases 8753-9426 (complementarias).

Descripción detallada

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos de la descripción que no entran dentro del alcance de la presente invención definido por las presentes reivindicaciones se presentan con fines comparativos.

La presente descripción proporciona, entre otras cosas, métodos, análisis y kits para detectar o cuantificar antígenos de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. De acuerdo con una realización de la presente descripción, los anticuerpos recombinantes de la descripción, incluyendo los anticuerpos quiméricos, se unen específicamente a las regiones relevantes para el diagnóstico de proteínas de *T. cruzi* y por lo tanto son adecuados para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico para la detección de *T. cruzi*, y/o como reactivos de normalización o reactivos de control positivo en los análisis para la detección de *T. cruzi*.

La presente descripción también proporciona por lo tanto un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, en donde cada anticuerpo es capaz de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. Los anticuerpos recombinantes pueden ser, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos, y similares. En otra realización, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende dos o más anticuerpos recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos. Opcionalmente, los anticuerpos utilizados en el reactivo de inmunodiagnóstico son cada uno específicos para una proteína antigénica de *T. cruzi* diferente, de tal manera que el reactivo de inmunodiagnóstico es capaz de detectar una pluralidad de antígenos de *T. cruzi*. Opcionalmente, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende al menos uno o más, o al menos dos o más, anticuerpos recombinantes específicos para los antígenos de *T. cruzi* seleccionados del grupo que consiste en un anticuerpo recombinante específico para el antígeno de Chagas FP3, un anticuerpo recombinante específico para el antígeno FP6 de Chagas, un anticuerpo recombinante específico para el antígeno FP10 de Chagas, y un anticuerpo recombinante específico para el antígeno FRA de Chagas. En otra realización más, el anticuerpo o los anticuerpos del reactivo de inmunodiagnóstico son nuevos anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma y son específicos para los antígenos de *T. cruzi* seleccionados del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno FP3 de Chagas, un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno FP6 de Chagas, un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno FP10 de Chagas, y un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno FRA de Chagas.

En una realización, la presente descripción proporciona el uso del reactivo de inmunodiagnóstico como un reactivo de normalización en un análisis de detección *T. cruzi*, por ejemplo, en lugar de suero humano. En este contexto, el reactivo de inmunodiagnóstico opcionalmente se puede utilizar, por ejemplo, para evaluar y normalizar el funcionamiento de los análisis de detección de *T. cruzi* actuales y futuros.

Éstos y realizaciones, características, aspectos, ilustraciones y ejemplos adicionales de la descripción se describen adicionalmente en las secciones que siguen. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta descripción.

A. Definiciones

En la presente memoria, las formas singulares "un", "una", "uno" y "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Para la enumeración de los intervalos numéricos en la presente memoria, se contempla cada número intermedio con el mismo grado de precisión de forma explícita. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo de 6,0-7,0, se contemplan los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 de forma explícita.

a) Aproximadamente

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a aproximadamente una variación de +/- 10% del valor establecido. Se debe entender que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en la presente memoria, se haga referencia o no a la misma específicamente.

b) Anticuerpo

El término "anticuerpo" (Ac) según se utiliza en la presente memoria comprende Ac sencillos dirigidos contra un ATC (un Ac anti-ATC), composiciones de Ac anti-ATC con especificidad poli-epitópica, Ac anti-ATC de cadena sencilla, y fragmentos de Ac anti-ATC. Un "anticuerpo monoclonal" (AcMo) se obtiene de una población sustancialmente homogénea de Ac, es decir, los Ac individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades mínimas. Los Ac ilustrativos incluyen policlonales (AcPo), monoclonales (AcMo), humanizados, biespecíficos (AcB), Ac heteroconjugados e inmunoglobulinas de dominio dual variable (DVD-Ig®) y derivados de inmunoglobulinas de dominio dual variable (tales como dominios variables triples) (Inmunoglobulinas de dominio dual variable y los métodos para fabricarlas los describen Wu, C., et al, en Nature Biotechnology, 25 (11): 1290-1297 (2007) y el documento WO2001/058956).

c) Fragmento de anticuerpo

El término "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpos", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada (*es decir*, C_H2, C_H3, y C_H4, dependiendo de isotipo de anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fab'-SH, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, diacuerpos, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de cadena pesada, y polipéptidos de cadena sencilla que contienen las tres CDR de la región variable de cadena pesada.

d) Anticuerpo bifuncional

El término "anticuerpo bifuncional", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que comprende un primer brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico y un segundo brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico diferente, es decir, los anticuerpos bifuncionales tienen una especificidad dual.

e) Muestra biológica

El término "muestra biológica" incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Las muestras biológicas de un sujeto contienen moléculas de polipéptido. Los ejemplos de las muestras biológicas incluyen sangre completa, suero, plasma, fluido intersticial, saliva, fluido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, fluido ascítico, mucosa, fluido nasal, esputo, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido vaginal, fluido menstrual, líquido amniótico y semen. Los métodos de detección pueden usarse para detectar un ATC en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un ATC incluyen análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Por otra parte, las técnicas *in vivo* para detectar un ATC incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-ATC marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse por técnicas de formación de imágenes convencionales.

B) Constantes de unión

El término "constante de velocidad de asociación", " k_{on} " o " k_a " según se utiliza indistintamente en la presente memoria, se refiere al valor que indica la velocidad de unión de un anticuerpo a su antígeno diana o la velocidad de formación de complejo entre un anticuerpo y el antígeno como se muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Anticuerpo ("Ab")} + \text{Antígeno ("Ag")} \rightarrow \text{Ab-Ag}.$$

El término "constante de velocidad de disociación", " k_{off} " o " k_d " según se utiliza indistintamente en la presente memoria, se refiere al valor que indica la velocidad de disociación de un anticuerpo a partir de su antígeno diana o separación de complejo Ab-Ag a lo largo del tiempo al anticuerpo libre y al antígeno como se muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Ab} + \text{Ag} \leftarrow \text{Ab-Ag}.$$

Los métodos para la determinación de constantes de asociación y de velocidad de disociación son bien conocidos en la técnica. La utilización de técnicas basadas en fluorescencia ofrece alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en el equilibrio. Se pueden utilizar otros enfoques y aparatos experimentales tales como un análisis BIAcore® (análisis de interacción biomolecular) (p. ej., aparato disponible de BIAcore International

AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Además, también se puede utilizar un análisis KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), disponible de Sapidyn Instruments (Boise, Idaho).

El término "constante de disociación en equilibrio" o " K_D " según se utiliza indistintamente, en la presente memoria, se refiere al valor obtenido dividiendo la velocidad de disociación (k_{off}) por la velocidad de asociación (k_{on}). La velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se utilizan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno.

g) Anticuerpo quimérico

El término "anticuerpo quimérico" (o "Acq") según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que comprende la totalidad o una parte de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de una especie anfitriona unidas a al menos parte de las regiones constantes del anticuerpo de otra especie anfitriona.

h) Que corresponde a o corresponde a

Los términos "que corresponde a" o "corresponde a" indican que una secuencia de ácido nucleico es idéntica a toda o una porción de una secuencia de ácido nucleico de referencia. El término "complementario a" se utiliza en la presente memoria para indicar que la secuencia de ácido nucleico es idéntica a toda o una porción de la cadena complementaria de una secuencia de ácido nucleico de referencia. Como ilustración, la secuencia de ácido nucleico "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA."

A menos que se especifique lo contrario en la presente memoria, todas las secuencias de ácidos nucleicos se escriben en una dirección 5' a 3', y todas las secuencias de aminoácidos se escriben en una dirección amino- a carboxi-terminal.

i) Anticuerpo derivatizado

El término "anticuerpo derivatizado" según utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o porción de anticuerpo que se derivatiza o conecta a otra molécula funcional. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser conectado funcionalmente, mediante acoplamiento químico, fusión genética, o asociación no covalente, *etc.*, a una o más moléculas, tales como otro anticuerpo, un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y un polipéptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula, tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina. Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por medio de entrecruzamiento de dos o más anticuerpos. Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son hetero-bifuncionales (p. ej., éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida) u homo-bifuncional (p. ej., suberato de disuccinimidilo). Tales conectores están disponibles de Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

j) Marca detectable

El término, "marcas detectables", según se utiliza en la presente memoria, incluyen moléculas o radicales que pueden detectarse directa o indirectamente. Además, estos agentes pueden ser derivatizados con anticuerpos e incluyen compuestos fluorescentes. Las clases de marcas incluyen materiales fluorescentes, luminiscentes, bioluminiscentes y radiactivos, enzimas y grupos prostéticos. Los marcadores útiles incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, estreptavidina/biotina, avidina/biotina, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina, luminol, luciferasa, luciferina, aequorina, e ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

k) Relevante para el diagnóstico

El término "relevante para el diagnóstico" según se utiliza en la presente memoria con referencia a una región de una proteína de *T. cruzi* se refiere a una región de la proteína cuya detección, ya sea sola o combinada con otras regiones relevantes para el diagnóstico de Chagas, permite la detección de *T. cruzi*. Los ejemplos de regiones relevantes para el diagnóstico incluyen regiones inmunodominantes conocidos en la técnica y regiones tales como las descritas en la presente memoria.

l) Epítopo, epítomos o epítomos de interés

Según utiliza en la presente memoria, el término "epítopo", "epítomos" o "epítomos de interés" se refiere a uno o varios sitios en cualquier molécula que es reconocido y es susceptible de unirse a uno o varios sitios complementarios sobre su compañero de unión específico. La molécula y el compañero de unión específico son parte de un par de unión específica. Por ejemplo, un epítopo puede ser un polipéptido, proteína, hapteno, antígeno carbohidratado (tal como, pero no limitado a, glicolípidos, glicoproteínas o lipopolisacáridos) o polisacárido y su

compañero de unión específico, puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo. Típicamente un epítipo está contenido dentro de un fragmento antigénico más grande (es decir, región o fragmento capaz de unirse a un anticuerpo) y se refiere a los residuos precisos conocidos para entrar en contacto con el compañero de unión específico. Es posible que un fragmento antigénico contenga más de un epítipo.

5 m) Anticuerpo humanizado

El término "anticuerpo humanizado", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que comprende una región variable modificada de un anticuerpo humano en donde una porción de la región variable ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana y en donde la región variable modificada está conectada a al menos parte de la región constante de un anticuerpo humano. En una realización, la porción de la región variable es toda o una parte de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El término también incluye anticuerpos híbridos producidos por corte y empalme de una región variable o una o más CDR de un anticuerpo no humano con una o varias proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen, tipo de proteína, denominación de la clase o subclase de inmunoglobulina, siempre y cuando los anticuerpos híbridos muestren la actividad biológica deseada (es decir, la capacidad de unirse específicamente a una proteína antigénica de *T. cruzi*).

20 n) Aislada o purificada

El término "aislada" o "purificada", cuando se refiere a una molécula, se refiere a una molécula que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interfieren en el uso diagnóstico o terapéutico. El término polipéptido o fragmento biológicamente activo (tal como un fragmento Fab) "aislado" o "purificado" según utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido o fragmento biológicamente activo que es separado y/o recuperado de un componente de su entorno. Los componentes contaminantes incluyen materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros materiales polipeptídicos o no polipeptídicos. Para ser sustancialmente aisladas, las preparaciones tienen menos de aproximadamente 30% en peso seco de contaminantes (es decir, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30%), usualmente menos de aproximadamente 20% (es decir, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%), menos de aproximadamente 10% (es decir, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 10%), y más a menudo, menos de aproximadamente 5% (es decir, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%) contaminantes. Un ATC producido por recombinación, aislado, V_L o V_H o porción biológicamente activa está deseablemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, aproximadamente 10%, o aproximadamente 5% del volumen de la preparación de ATC, V_L o V_H . Por lo tanto, un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de *T. cruzi* puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos de *T. cruzi*, tales como, por ejemplo, un anticuerpo que se une al epítipo Pep2, que se encuentra en los polipéptidos Tcf y 6PM de Chagas.

40 o) Reactivos de Control de Calidad

Según se describe en la presente memoria, los inmunoanálisis incorporan "reactivos de control de calidad" que incluyen pero no se limitan a, p. ej., calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Un "calibrador" o "patrón" se utiliza típicamente (p. ej., uno o más, o una pluralidad) con el fin de establecer curvas de calibración (patrones) para la interpolación de la concentración de anticuerpo. Opcionalmente, se puede utilizar un solo calibrador cerca del punto de corte positivo/negativo. Se pueden utilizar juntos calibradores múltiples (es decir, más de un calibrador o una cantidad variable de calibradores) con el fin de que comprenda un "panel de sensibilidad. Se utiliza un "control positivo" para establecer las características de rendimiento del análisis y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (p. ej., antígenos).

p) Anticuerpo recombinante o anticuerpos recombinantes

El término "anticuerpo recombinante" o "anticuerpos recombinantes," según utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo preparado por medio de una o más etapas que incluyen la clonación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican la totalidad o una parte de uno o más anticuerpos monoclonales en un vector de expresión apropiado mediante técnicas recombinantes y, posteriormente, la expresión del anticuerpo en una célula anfitriona apropiada. El término incluye por tanto, pero no se limita a, los anticuerpos producidos de forma recombinante, que son anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados (total o parcialmente humanizados), estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos (incluyendo moléculas de tipo IgG tetravalentes denominadas inmunoglobulina de dominio dual variable, DVD-Ig®), y anticuerpos bifuncionales.

q) Específico o especificidad

Según se utiliza en la presente memoria, "específico" o "especificidad" en el contexto de una interacción entre los miembros de un par de unión específica (p. ej., un antígeno y un anticuerpo) se refiere a la reactividad selectiva de la interacción. La frase "se une específicamente a" y términos análogos de los mismos se refieren a la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a una proteína de *T. cruzi* y no unirse específicamente a otras entidades. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de *T. cruzi* pueden ser identificados, por ejemplo, mediante inmunoanálisis de diagnóstico (p. ej., radioinmunoanálisis ("RIA") y análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA") (Véanse, por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, 2ª ed., Raven Press, Nueva York, páginas 332-336 (1989)), BIAcore® (análisis de interacción biomolecular, aparato disponible de BIAcore International AB, Uppsala, Suecia), KinExA® (Kinetic Exclusion Assay, disponible de Sapidyn Instruments (Boise, Idaho)) u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

r) Sustancialmente idéntica

El término "sustancialmente idéntica", según se utiliza en la presente memoria con respecto a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos indica que, cuando se alinean óptimamente, por ejemplo usando los métodos descritos a continuación, la secuencia de ácido nucleico o de aminoácido comparte al menos aproximadamente 70% (p. ej., de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 75% (p. ej., de aproximadamente 75% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 80% (p. ej., de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 85% (p. ej., de aproximadamente 85% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 90% (p. ej., de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 95% (p. ej., de aproximadamente 95% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 96% (p. ej., de aproximadamente 96% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 97% (p. ej., de aproximadamente 97% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 98% (p. ej., de aproximadamente 98% a aproximadamente 100%), o al menos aproximadamente 99% (p. ej., de aproximadamente 99% a aproximadamente 100%) de identidad de secuencia con una segunda secuencia de ácido nucleico o aminoácidos definida (o "secuencia de referencia"). Se puede utilizar "identidad sustancial" para referirse a diversos tipos y longitudes de secuencia, tales como secuencia completa, epítomos o péptidos inmunogénicos, dominios funcionales, secuencias codificantes y/o reguladoras, exones, intrones, promotores, y secuencias genómicas. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico se puede determinar de varias maneras que están dentro del conocimiento práctico de un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando soporte lógico informático disponible públicamente, tal como Smith Waterman Alingment (Smith, T.F. y M.S. Waterman (1981) J. Mol Biol 147: 195-7); "BestFit" (Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489 (1981)) incorporado en GeneMatcher Plus™, Schwarz y Dayhof (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhof, M. O., Ed págs. 353-358; programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10), y variaciones del mismo incluyendo soporte lógico BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL, and Megalign (DNASTAR). Además, los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud de las secuencias que se comparan. En general, para las secuencias de aminoácidos, la longitud de las secuencias de comparación es de al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Un experto en la técnica entiende que la longitud real depende de la longitud total de las secuencias que se comparan y puede ser de al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos sobre 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 110, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 130, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, o al menos aproximadamente 350 aminoácidos, o puede ser la longitud completa de la secuencia de aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación es generalmente de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, pero puede ser de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 650, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos, o puede ser la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico.

s) Resonancia de plasmón superficial

El término "resonancia de plasmón superficial", según se utiliza en la presente memoria se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo utilizando el sistema Biacore® (Biacore (GE Healthcare)) (Johnsson, B., et al. 1991. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. Anal Biochem. 198:268-77;

Johnsson, B., et al. 1995. Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. J Mol Recognit. 8:125-31; Jonsson, U., et al. 1993. Introducing a biosensor based technology for real-time biospecific interaction analysis. Ann Biol Clin (Paris). 51:19-26).

t) ATC

La abreviatura "ATC", según se utiliza en la presente memoria, significa "antígeno de *T. cruzi*." FP3, Pep2, TcF, 6PM, y FP10 se refieren a los ATC y se definen más adelante. Otras abreviaturas se definen a medida que se introducen.

La terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones concretas y no se pretende por lo demás que sea limitante.

B. Anticuerpos anti-*T. cruzi* y líneas celulares que los producen

La presente descripción proporciona, entre otras cosas, nuevos anticuerpos, las líneas celulares que producen estos anticuerpos, y métodos de fabricación de estos anticuerpos. Estos anticuerpos se unen a varios antígenos de *T. cruzi* (ATC) e incluyen los contenidos en los polipéptidos FP3, Pep2 (TcF, FP6) y FP10, y se pueden utilizar como AcMo, tales como AcMo de ratón, inmunoglobulina de dominio dual variable (DVD-Ig[®]) o como anticuerpos quiméricos, tales como quimeras de ratón-humano (Mu-HU). Estos anticuerpos son útiles como controles positivos en los inmunoanálisis. Además, los anticuerpos pueden utilizarse para purificar polipéptidos de *T. cruzi* que albergan los ATC. Los ejemplos de los anticuerpos y las líneas celulares de la presente descripción se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Compendio de Antígenos de *T. cruzi* y líneas celulares productoras de anticuerpos¹

Antígeno		Línea celular de hibridoma		Línea celular CHO		
Nombre de Antígeno	Nombre de Línea Celular	Nombre de Laboratorio	Depósito de la ATCC * [Fecha de depósito]	Nombre de Línea Celular	Nombre de Laboratorio	Depósito de la ATCC * [Fecha de depósito]
FP3	HBFP3	Chagas FP3 12-392-150-110	PTA-8139 [01/24/07]	CHOFP3	Chagas FP3 12-392-150CHO2580-104	PTA-8136 [01/24/07]
Pep2 (TCF, 6PM)	HBPep2	Chagas 9-638-132-115	PTA-8137 [01/24/07]	CHOPEP2	Chagas Pep2 9-638-1928	PTA-8138 [01/24/07]
FP10	HBF10	Chagas 10-745-140	PTA-8141 [01/24/07]	CHOFP10	Chagas FP10 10-745-3796	PTA-8140 [01/24/07]

¹Otra línea celular de hibridoma, nombre de laboratorio de Chagas 8-367-171 y que produce un AcMo que se une al antígeno FRA recombinante, se deposita como PTA-8142 (también depositada en 01/24/07).

* Todos los depósitos de líneas celulares se realizaron en el marco del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes (Tratado de Budapest) de 28 de Abril 1977 y modificado el 26 de Septiembre., 1980 American Type Culture Collection (ATCC); P.O. Box 1549; Manassas, VA 20108; USA.

Otros ejemplos de anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos que:

- (a) que se unen específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FRA y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $5,7 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,3 \times 10^{-7}\text{M}$;
- (b) que se unen específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es Pep2 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $6,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}\text{M}$;
- (c) que se unen específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP10 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: (a) una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (B) una constante de

velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $1,0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$; y (c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-10} \text{M}$ y aproximadamente $1,6 \times 10^{-8} \text{M}$;

(d) que se unen específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP3 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y aproximadamente $6,0 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-12} \text{M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-9} \text{M}$; y

(e) cualquier combinación de (a)-(d).

Para preparar los anticuerpos anti-*T. cruzi* y las líneas celulares productoras de estos anticuerpos como se describe adicionalmente en la presente memoria, generalmente se siguió un proceso de dos etapas: (1) se desarrollaron líneas celulares de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales que se unían específicamente a los antígenos de interés - los epítomos de *T. cruzi* (ATC); y (2) los anticuerpos quiméricos se modificaron genéticamente utilizando tecnologías recombinantes, y a continuación se utilizaron líneas celulares de expresión de mamífero para producir los anticuerpos modificados genéticamente. En esta segunda parte, después de identificar las líneas celulares de hibridoma que secretan los AcMo deseados, el ARNm se aisló de estas células y se identificaron las secuencias génicas de los anticuerpos. Las secuencias de polinucleótidos ligera variable (V_L) y pesada variable (V_H) fueron clonadas en vectores pBOS (que proporcionan las secuencias de anticuerpos humanos) que a continuación fueron co-transfectadas en un sistema de expresión transitoria para confirmar que los anticuerpos quiméricos resultantes eran funcionales. Tras la confirmación, las secuencias V_L fueron subclonadas en el plásmido pJV, y las secuencias V_H en el plásmido pBV; estos vectores, se utilizaron a continuación para construir un vector de expresión pBJ estable. Las células CHO fueron transfectadas con pBJ, se seleccionaron los transfectantes, y los anticuerpos secretados se sometieron a ensayo de nuevo, lo que permite la producción a escala industrial. Por lo tanto, las regiones V_H y V_L de ratón se combinaron con las regiones de la cadena constante humana (CH) y la cadena ligera constante (CL) para crear ejemplares de los anticuerpos quiméricos de la descripción. Por lo tanto, los anticuerpos quiméricos conservan la especificidad funcional del AcMo de ratón y la afinidad por el ATC, pero reaccionan en análisis de anticuerpos que están diseñados para detectar inmunoglobulina humana (Ig). En una realización, la descripción se refiere a anticuerpos monoclonales (AcMo) que se unen específicamente a los ATC FP3, Pep2 (FP6/Tcf), FP10 y FRA. Los ratones se inmunizan individualmente con los antígenos recombinantes FP3, Pep2, FP10 o FRA, los ratones productores de anticuerpos se identifican y se sacrifican, las células del bazo se cosechan y se fusionan con células de mieloma, y se aíslan las líneas celulares de hibridoma que producen los AcMo.

C. Reactivo de inmunodiagnóstico

El reactivo de inmunodiagnóstico de la presente descripción comprende uno o más anticuerpos descritos en la presente memoria (Véanse, por ejemplo, las Secciones B y E en la presente memoria). Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden el reactivo de inmunodiagnóstico pueden incluir anticuerpos recombinantes, que también incluyen en la presente memoria anticuerpos quiméricos recombinantes, que se unen específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. Por lo tanto, en una realización, el reactivo de inmunodiagnóstico proporcionado por la presente descripción comprende un único anticuerpo capaz de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. En otras realizaciones, el reactivo de inmunodiagnóstico proporcionado por la presente descripción comprende un único anticuerpo quimérico capaz de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. En otras realizaciones, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende una pluralidad de anticuerpos, que puede incluir uno o más anticuerpos recombinantes, tales como un anticuerpo quimérico recombinante, cada uno capaz de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi* (p. ej., ya sea la misma región o de una región diferente). Uno o más de la pluralidad de anticuerpos quiméricos pueden ser capaces de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de la misma proteína de *T. cruzi*. Alternativamente, cada uno de la pluralidad de anticuerpos quiméricos puede unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi* diferente.

En una realización, de la presente descripción, el reactivo de inmunodiagnóstico es capaz de detectar una pluralidad de antígenos de *T. cruzi* y opcionalmente comprende dos o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a un diferente proteína antigénica de *T. cruzi*. En una realización adicional, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende opcionalmente tres o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a una proteína antigénica de *T. cruzi* diferente. En otra realización, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende opcionalmente cuatro o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a una proteína antigénica de *T. cruzi* diferente.

Los anticuerpos recombinantes comprendidos en el reactivo de inmunodiagnóstico se pueden modificar opcionalmente, por ejemplo, para propósitos de detección, para la inmovilización sobre un soporte sólido, para

mejorar la estabilidad y/o para mejorar las propiedades farmacocinéticas, o por otros medios, como es conocido en la técnica.

D. Antígenos de *T. cruzi*

T. cruzi es un organismo complejo, con un ciclo de vida complejo. Sin embargo, se han identificado antígenos importantes que son útiles para la detección de diagnóstico del parásito.

El antígeno FP3 (Kirchhoff, L.V., y K. Otsu. Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0132077. 2004) es una proteína recombinante que corresponde esencialmente a la combinación de Ag15 de *T. cruzi* (Otsu, K., et al. 1993. Interruption of a Trypanosoma cruzi gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. Mol Biochem Parasitol. 57:317-30) y Proteína C de *T. cruzi*, siendo esta última una proteína flagelar de unión de calcio (González, A., et al. 1985. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in Trypanosoma cruzi. Nucleic Acids Res. 13:5789-804). La secuencia de polinucleótido (SEQ ID NO.: 1) y la secuencia de polipéptido (SEQ ID NO.: 2) se muestran a continuación en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos específicas para las repeticiones de 14 aminoácidos de *T. cruzi* están subrayadas en la Tabla 3, los aminoácidos que corresponden a Proteína A de *T. cruzi* están en **negrita** en la Tabla 3, los aminoácidos correspondientes a la Proteína B están en *cursiva* en la Tabla 3 y los aminoácidos correspondientes a la proteína C están con doble subrayado en la Tabla 3.

Tabla 2: Secuencia de polinucleótido de FP3 (SEQ ID NO.:1)

ATGCCCCAGC	TCCAACAGGC	AGAAAATAAT	ATCACTAATT	CCAAAAAAGA	AATGACAAAG
CTACGAGAAA	AAGTGAAAAA	GGCCGAGAAA	GAAAAATTGG	ACGCCATTAA	CCGGGCAACC
AAGCTGGAAG	AGGAACGAAA	CCAAGCGTAC	AAAGCAGCAC	ACAAGGCAGA	GGAGGAAAAG
GCTAAACAT	TTCAACGCCT	TATAACATTT	GAGTCGGAAA	ATATTAACCT	AAAGAAAAGG
CCAAATGACG	CAGTTTCAAA	TCGGGATAAG	AAAAAAAATT	CTGAAACCGC	AAAACTGAC
GAAGTAGAGA	AACAGAGGGC	GGCTGAGGCT	GCCAAGGCCG	TGGAGACGGA	GAAGCAGAGG
GCAGCTGAGG	CCACGAAGGT	TGCCGAAGCG	GAGAAGCGGA	AGGCAGCTGA	GGCCGCCAAG
GCCGTGGAGA	CGGAGAAGCA	GAGGGCAGCT	GAAGCCACGA	AGGTTGCCGA	AGCGGAGAAG
CAGAAGGCAG	CTGAGGCCGC	CAAGGCCGTG	GAGACGGAGA	AGCAGAGGGC	AGCTGAAGCC
ACGAAGGTTG	CCGAAGCGGA	GAAGCAGAGG	GCAGCTGAAG	CCATGAAGGT	TGCCGAAGCG
GAGAAGCAGA	AGGCAGCTGA	GGCCGCCAAG	GCCGTGGAGA	CGGAGAAGCA	GAGGGCAGCT
GAAGCCACGA	AGGTTGCCGA	AGCGGAGAAG	CAGAAGGCAG	CTGAGGCCGC	CAAGGCCGTG
GAGACGGAGA	AGCAGAGGGC	AGCTGAAGCC	ACGAAGGTTG	CCGAAGCGGA	GAAGCAGAAG
GCAGCTGAGG	CCGCCAAGGC	CGTGGAGACG	GAGAAGCAGA	GGGCAGCTGA	AGCCACGAAG
GTTGCCGAAG	CGGAGAAGGA	TATCGATCCC	ATGGGTGCTT	GTGGGTGCGA	GGACTCGACG
AGCGACAAGG	GGTTGGCGAG	CGATAAGGAC	GGCAAGAACG	CCAAGGACCG	CAAGGAAGCG
TGGGAGCGCA	TTGCCCAGGC	GATTCTCTGT	GAGAAGACCG	CCGAGGCAAA	ACAGCGCCGC
ATCGAGCTCT	TCAAGAAGTT	CGACAAGAAC	GAGACCGGGA	AGCTGTGCTA	CGATGAGGTG
CACAGCGGCT	GCCTCGAGGT	GCTGAAGTTG	GACGAGTTCA	CGCCGCGAGT	GCGCGACATC
ACGAAGCGTG	CATTGACAAA	GGCGAGGGCC	CTGGGCAGCA	AGCTGGAGAA	CAAGGGCTCC
GAGGACTTTG	TTGAATTTCT	GGAGTTCCGT	CTGATGCTGT	GCTACATCTA	CGACTTCTTC
GAGCTGACGG	TGATGTTTCA	CGAGATTGAC	GCCTCCGGCA	ACATGCTGGT	TGACGAGGAG
GAGTTCAAGC	GCGCCGTGCC	CAGGCTTGAG	GCGTGGGGCG	CCAAGGTCGA	GGATCCCGCG
GCGCTGTTCA	AGGAGCTCGA	TAAGAACGGC	ACTGGGTCCG	TGACGTTTCGA	CGAGTTTGCT
GCGTGGGCTT	CTGCAGTCAA	ACTGACGCC	GACGGCGACC	CGGACAACGT	GCCGGAGAGC

Table 2: FP3 polynucleotide sequence (SEQ ID NO.:1)

ATGGCCCAGC	TCCAACAGGC	AGAAAATAAT	ATCACTAATT	CCAAAAAAGA	AATGACAAAG
CTACGAGAAA	AAGTGAAAAA	GGCCGAGAAA	GAAAAATTGG	ACGCCATTAA	CCGGGCAACC
AAGCTGGAAG	AGGAACGAAA	CCAAGCGTAC	AAAGCAGCAC	ACAAGGCAGA	GGAGGAAAAG
GCTAAACAT	TTCAACGCCT	TATAACATTT	GAGTCGGAAA	ATATTAACTT	AAAGAAAAGG
CCAAATGACG	CAGTTTCAAA	TCGGGATAAG	AAAAAAAATT	CTGAAACCGC	AAAAACTGAC
GAAGTAGAGA	AACAGAGGGC	GGCTGAGGCT	GCCAAGGCCG	TGGAGACGGA	GAAGCAGAGG
GCAGCTGAGG	CCACGAAGGT	TGCCGAAGCG	GAGAAGCGGA	AGGCAGCTGA	GGCCGCCAAG
GCCGTGGAGA	CGGAGAAGCA	GAGGGCAGCT	GAAGCCACGA	AGGTTGCCGA	AGCGGAGAAG
CAGAAGGCAG	CTGAGGCCGC	CAAGGCCGTG	GAGACGGAGA	AGCAGAGGGC	AGCTGAAGCC
ACGAAGGTTG	CCGAAGCGGA	GAAGCAGAGG	GCAGCTGAAG	CCATGAAGGT	TGCCGAAGCG
GAGAAGCAGA	AGGCAGCTGA	GGCCGCCAAG	GCCGTGGAGA	CGGAGAAGCA	GAGGGCAGCT
GAAGCCACGA	AGGTTGCCGA	AGCGGAGAAG	CAGAAGGCAG	CTGAGGCCGC	CAAGGCCGTG
GAGACGGAGA	AGCAGAGGGC	AGCTGAAGCC	ACGAAGGTTG	CCGAAGCGGA	GAAGCAGAAG
GCAGCTGAGG	CCGCCAAGGC	CGTGGAGACG	GAGAAGCAGA	GGGCAGCTGA	AGCCACGAAG
GTTGCCGAAG	CGGAGAAGGA	TATCGATCCC	ATGGGTGCTT	GTGGGTCGAA	GGACTCGACG
AGCGACAAGG	GGTTGGCGAG	CGATAAGGAC	GGCAAGAACG	CCAAGGACCG	CAAGGAAGCG
TGGGAGCGCA	TTGCCCAGGC	GATTCTCTGT	GAGAAGACCG	CCGAGGCAAA	ACAGCGCCGC
ATCGAGCTCT	TCAAGAAGTT	CGACAAGAAC	GAGACCGGGA	AGCTGTGCTA	CGATGAGGTG
CACAGCGGCT	GCCTCGAGGT	GCTGAAGTTG	GACGAGTTCA	CGCCGCGAGT	GCGCGACATC
ACGAAGCGTG	CATTTCGACAA	GGCGAGGGCC	CTGGGCAGCA	AGCTGGAGAA	CAAGGGCTCC
GAGGACTTTT	TGAATTTCT	GGAGTTCCGT	CTGATGCTGT	GCTACATCTA	CGACTTCTTC
GAGCTGACGG	TGATGTTTGA	CGAGATTGAC	GCCTCCGCA	ACATGCTGGT	TGACGAGGAG
GAGTTCAAGC	GCGCCGTGCC	CAGGCTTGAG	GCGTGGGGCG	CCAAGGTCGA	GGATCCCGCG
GCGCTGTTCA	AGGAGCTCGA	TAAGAACGGC	ACTGGGTCCG	TGACGTTTGA	CGAGTTTGCT
GCGTGGGCTT	CTGCAGTCAA	ACTGGACGCC	GACGGCGACC	CGGACAACGT	GCCGGAGAGC

CCGAGACCGA TGGAATC

5 Tabla 3: secuencia de polipéptido de FP3 (SEQ ID NO.: 2)

MAQLQQAENN ITNSKKEMTK LREKVKAEEK EKLDAINRAT KLEEEERNQAY KAAHKAEEEE AKTFORLITF ESENINLKRR PNDAVSNRDK KKNSETAKTD EV
<u>EKQRAAEAAKAVET</u>
<u>EKQRAAEATKVAEA</u>
<u>EKRKAAEAAKAVET</u>
<u>EKQRAAEATKVAEA</u>
<u>EKQKAAEAAKAVET</u>
<u>EKQRAAEATKVAEA</u>
<u>EKQRAAEAMKVAEA</u>
<u>EKQKAAEAAKAVET</u>
<u>EKQRAAEATKVAEA</u>
<u>EKQKAAEAAKAVET</u>
<u>EKQRAAEATKVAEA</u>
<u>EKQKAAEAAKAVET</u>

EKQRAAEATKVAEA

EKDIDP MGACGSKDST SDKGLASDKD GKNADRKEA WERIQAIPR EKTAERKORR

IELFKKFDKN ETGKLCYDEV HSGCLEVLKL DEFTPRVRDI TKRAFDKARA LGSKLENKGS

EDFVEFLEFR LMLCYIYDFF ELTVMFEID ASGNMLVDEE EFKRAVPRLE AWGAKVEDPA

ALFKELDKNG TGSVTFDEFA AWASAVKLDA DGDNDVPES PRPMGI

El antígeno Pep2 (Kirchhoff y Otsu, 2004) es una proteína recombinante de secuencias repetidas de *T. cruzi*. FP6 y Tcf, polipéptidos de *T. cruzi*, tienen ambos el antígeno Pep2. La secuencia de polinucleótido (SEQ ID NO.: 3) y la secuencia de polipéptido (SEQ ID NO.: 4) se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4: Secuencia de polinucleótido de Pep2 (SEQ ID NO.: 3)

GGTGACAAAC CATCACCATT TGGACAGGCC GCAGCAGGTG ACAAACCATC ACCATTGGGA
CAGGCC

Tabla 5: Secuencia de polipéptido de Pep2 (SEQ ID NO.: 4).

GDKPSPFGQA AAGDKPSPFG QA

El antígeno FP10 (Kirchhoff y Otsu, 2004) es otra proteína recombinante de secuencias repetidas de *T. cruzi*. Sus secuencias de polinucleótido (SEQ ID NO.: 5) y de polipéptido (SEQ ID NO.: 6) se muestran a continuación en las Tablas 6 y 7, respectivamente. La secuencia de aminoácidos del dominio I está subrayada en la Tabla 7, la secuencia de aminoácidos del dominio J está en *cursiva* en la Tabla 7, la secuencia de aminoácidos del dominio K está en **negrita** en la Tabla 7 y la secuencia de aminoácidos del dominio L está con doble subrayado en la Tabla 7.

Tabla 6: Secuencia de polinucleótido de FP10 (SEQ ID NO.: 5)

GATCCAACGT ATCGTTTTGC AAACCACGCG TTCACGCTGG TGGCGTCGGT GACGATTCAC GAGGTTCCGA
GCGTCGCGAG TCCTTTGCTG GGTGCGAGCC TGGACTCTTC TGGTGGCAAA AAATCCTTGG GGCTCTCGTA
CGACGAGAAG CACCAGTGGC AGCCAATATA CGGATCAACG CCGGTGACGC CGACCGGATC GTGGGAGATG
GGTAAGAGGT ACCACGTGGT TCTTACGATG GCGAATAAAA TTGGCTCCGT GTACATTGAT GGAGAACCCTC
TGGAGGGTTC AGGGCAGACC GTTGTGCCAG ACGAGAGGAC GCCTGACATC TCCCACTTCT ACGTTGGCGG
GTATGGAAGG AGTGATATGC CAACCATAAG CCACGTGACG GTGAATAATG TTCTTCTTTA CAACCGTCAG
CTGAATGCCG AGGAGATCAG GACCTTGTTT TTGAGCCAGG ACCTGATTGG CACGGAAGCA CACATGGGCA
GCAGCAGCGG CAGCAGTGCC CACGGTACGC CCTCGATTCC CGTTGACAGC AGTGCCACG GTACACCCCTC
GACTCCCGTT GACAGCAGTG CCCACGGTAC GCCCTCGACT CCCGTTGACA GCAGTGCCCA CGGTACACCC
TCGACTCCCG TTGACAGCAG TGCCACGGT ACACCCCTCGA CTCCCGTTGA CAGCAGTGCC CACGGTAAGC
CCTCGACTCC CGCTGACAGC AGTGCCCAACA GTACGCCCTC GACTCCCGCT GACAGCAGTG CCCACAGTAC
GCCCTCAATT CCCGCTGACA GCAGTGCCCA CAGTACGCCC TCAGCTCCCG CTGACAACGG CGCCAATGGT
ACGGTTTTGA TTTTGTGAC TCATGACGCG TACAGGCCCG TTGATCCCTC GCGGTACAAG CGCGCCTTGC
CGCAGGAAGA GCAAGAGGAT GTGGGGCCCG GCCACGTTGA TCCCGACCAC TTCCGCTCGA CCTCGACGAC
TCATGACGCG TACAGGCCCG TTGATCCCTC GCGGTACAAG CGCGCCTTGC CGCAGGAAGA GCAAGAGGAT
GTGGGGCCCG GCCACGTTGA TCCCGACCAC TTCCGCTCGA CGACTCATGA CGGTACAGG CCCGTTGATC
CCTCGGCGTA CAAGCGCGCC TTGCGCAGG AAGAGCAAGA GGATGTGGGG CCGCGCCACG TTGATCCCGA
CCACTTCCCG TCGACCTCGA CGACTCATGA CGGTACAGG CCCGTTGATC CCTCGGCGTA CAAGCGCGCC
TTGCGCAGG AAGAGCAAGA GGATGTGGGG CCGCGCCACG TTGATCCCGA CCACTTCCCG TCGACCTCGA
CGACTCATGA CGGTACAGG CCCGTTGATC CCTCGGCGTA CAAGCGCGCC TTGCGCAGG AAGAGCAAGA
GGATGTGGGG CCGCGCCACG TTGATCCCGA CCACTTCCCG TCGACGACTC ATGACGCGTA CAGGCCCGTT
GATCCCTCGG CGTACAAGCG CGCCTTGCCG CAGGAAGAGC AAGAGGATGT GGGGCCGCGC CACGTTGATC
CCGACCACTT CCGCTCG

Tabla 7: Secuencia de polipéptido de FP10 (SEQ ID NO.: 6)

DPTYRFANHA	FTLVASVTIH	EVPSVASPLL	GASLDSSGGK	KLLGLSYDEK	HQWQPIYGST	PVTPTGSWEM
GKRYHVVLTM	ANKIGSVYID	GEPLEGSGQT	VVPDERTPDI	SHFYVGGYGR	SDMPTISHVT	VNNVLLYNRQ
LNAEEIRTLF	LSQDLIGTEA	HMGSSSG				
SSAHGTPSIPVD						
SSAHGTPSTPVD						
SSAHGTPSTPVD						
SSAHGTPSTPVD						
SSAHGTPSTPVD						
SSAHGKPTPAD						
SSAHSTPTPAD						
SSAHSTPSIPAD						
SSAHSTPSAPAD						
NGANGTV	LILSTHDAYR	PVDPSAYKRA	LPOEEQEDVG	PRHVDPDHFR	STSTTHDAYR	PVDPSAYKRA
LPQEEQEDVG	PRHVDPDHFR	STTHDAYRPV	DPSAYKRALP	QEEQEDVGPR	HVDPDHFRST	STTHDAYRPV
DPSAYKRALP	QEEQEDVGPR	HVDPDHFRST	STTHDAYRPV	DPSAYKRALP	QEEQEDVGPR	HVDPDHFRST
THDAYRPVDP	SAYKRALPQE	EQEDVGPRHV	DPDHFRS			

El antígeno FRA es una secuencia de la proteína repetitiva flagelar (Lafaille, J. J., etc. 1989. Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Mol Biochem Parasitol. 35:127-36), Acceso GenBank J04015, se muestra a continuación en la Tabla 8 (secuencia de polinucleótido, SEQ ID NO.: 7) y 9 (secuencia de polipéptido; SEQ ID NO.: 8).

Tabla 8: Secuencia de polinucleótido de FRA (SEQ ID NO.: 7)

ATGGAGTCAG	GAGCGTCAGA	TCAGCTGCTC	GAGAAGGACC	CGCGTCAGGA	ACGCGAAGGA
GATTGCTGCG	CTTGAGGAGA	GTCAATGAATG	CCCGCGICAT	CAGGAGCTGG	CGCGCGAGAA
GAAGCTTGCC	GACCGCGCGT	TCCTTGACTC	AGAAGCCGGA	GCGCGTGCCG	CTGGCTGACG
TGCCGCTCGA	CGACGATCAG	CGACTTTGTT	GCG		

Tabla 9: Secuencia de polipéptido de FRA (SEQ ID NO.: 8).

MEQERRQLLE	KDPRRNAKEI	AAL EESMNAR	AQELAREKKL	ADRAFLDQKP	ERVPLADVPL
DDDSDFVA					

Los ATC de los SEQ ID NO.: 2, 4, 6 y 8 se pueden sintetizar *in vitro* o expresar de forma recombinante a partir de secuencias de polinucleótidos, tales como las sustancialmente similares a los SEQ ID NO.: 1, 3, 5 y 7. Debido a la redundancia en el código genético y la capacidad de los polipéptidos de los SEQ ID NO.: 2, 4, 6 y 8 para tolerar sustituciones, no se necesita que las secuencias sean idénticas para llevar a la práctica la descripción. Las identidades de las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos pueden variar entre aproximadamente 70% y aproximadamente 100% (especialmente de aproximadamente 90% a aproximadamente 97%), tal como aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% y por supuesto, aproximadamente 100%.

Los TCA se pueden sintetizar fácilmente *in vitro* utilizando química de polipéptidos. Por ejemplo, la síntesis de polipéptidos puede llevarse a cabo de una manera escalonada sobre un soporte en fase sólida utilizando un sintetizador de polipéptidos automático, tal como un Sintetizador de Péptidos Rainin Symphony, Sintetizador de Péptidos Advanced Chemtech, un Sistema de Síntesis Argonaut Parallel, o un Sintetizador de Péptidos Applied

Biosystems. El aparato sintetizador de péptidos combina la química Fmoc con activación/HBTU/HOBt DIEA para llevar a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida.

La síntesis comienza con el aminoácido C-terminal, en donde el extremo carboxilo se une covalentemente a una resina de soporte polimérico insoluble. Las resinas útiles pueden cargar de 0,1 mmoles a 0,7 mmoles de aminoácido C-terminal por gramo de resina; presentan resistencia de visualización a los diversos disolventes y productos químicos utilizados durante un ciclo sintético típico, tales como diclorometano (DCM), N,N-dimetilformamida (DMF), N-metil-pirrolidona (NMP), N,N-dimetilamina (DMA), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 2-(1-H-benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), N,N-diisopropiletilamina (DIEA), metanol (MeOH), o agua; y son susceptibles de aplicaciones de síntesis de flujo continuo o por lotes. Los ejemplos de resinas útiles incluyen resina de Alcohol p-Benciloxibencílico (resina HMP), resina de PEG co-Merrifield, resina NovaSyn TGA® (Novabiochem), resina AM con 4-sulfamilbutirilo, y resina de amida CLEAR. Las resinas acopladas a aminoácidos son asequibles comercialmente de varias fuentes diferentes, aunque tales resinas acopladas también se pueden preparar en el laboratorio.

El extremo N-terminal del aminoácido acoplado a la resina (o polipéptido) está protegido químicamente por un grupo 9-flourenilmtoxycarbonilo (Fmoc) que se retira antes de la adición del siguiente reaccionante ácidoamino N-terminal. El grupo Fmoc es un grupo protector lábil alcalino que es eliminado fácilmente por soluciones concentradas de aminas, tales como piperidina 20-55%, en un disolvente adecuado, tal como NMP o DMF. Otras aminas útiles para la desprotección de Fmoc incluyen tris(2-aminoetil)amina, 4-(aminometil)piperidina, fluoruro de tetrabutilamonio, y 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU). La eliminación completa del grupo Fmoc del extremo N es importante para que todas las cadenas de polipéptidos acoplados a la resina participen eficazmente en cada ciclo de acoplamiento; de lo contrario, se producirán cadenas de polipéptidos de longitud y secuencia heterogéneas. Después de la eliminación catalizada por base del grupo Fmoc, la resina se lavó exhaustivamente con un tampón adecuado para eliminar el catalizador alcalino.

Las cadenas laterales de muchos aminoácidos contienen grupos químicamente reactivos, tales como aminas, alcoholes, o tioles. Estas cadenas laterales deben ser protegidas adicionalmente para evitar reacciones secundarias no deseadas durante la etapa de acoplamiento. Los grupos protectores de cadena lateral son estables frente a los álcalis, más preferiblemente, son más útiles tanto estables frente a los álcalis como lábiles frente a los ácidos. La Tabla 10 proporciona un conjunto ilustrativo de los grupos de protección de la cadena lateral para esta categoría de aminoácidos.

Tabla 10. Reactivos de protección de la cadena lateral

Protección de la cadena lateral	Aminoácido
t-butil éter	Ser, Thr, Tyr;
éster t-butílico	Glu y Asp
Tritilo	Cys, His, Asn y Gln
2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo	Arg
butoxicarbonilo (tBoc)	Lys

El grupo carboxilato del aminoácido protegido con Fmoc entrante se activa a fin de lograr el acoplamiento químico eficaz al extremo N-terminal del polipéptido unido a la resina. La activación se lleva a cabo típicamente mediante reacción de un aminoácido protegido con Fmoc con un reactivo adecuado para producir un éster reactivo. Los ejemplos de los ésteres activados incluyen el éster pentafluorofenílico (OPfp) y el éster de 3-hidroxi-2,3-dihidro-4-oxo-benzo-triazona (ODhbt), éster OBT, y el éster de Oat derivado de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). Las reacciones de acoplamiento se pueden realizar *in situ* utilizando reactivos activadores, tales como DCC, BOP, BOP-Cl, TBTU, HBTU o hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU). Las reacciones de acoplamiento ilustrativas incluyen una mezcla de HOBt y HBTU, o una mezcla de HOBt, HBTU, y DIEA. Para los N-metilaminoácidos, las condiciones de acoplamiento pueden utilizar hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP) como único reactivo de acoplamiento, y la reacción de acoplamiento se realiza manualmente en DCM con DIEA presente en N₂. El aminoácido protegido con Fmoc está presente en exceso molar con respecto al polipéptido unido a la resina. Para las reacciones de acoplamiento que proceden con una velocidad lenta, las reacciones de acoplamiento se repiten una o más veces (acoplamiento doble o múltiple) para asegurar que todo el polipéptido unido a la resina ha experimentado una reacción de adición satisfactoria con el Fmoc-aminoácido activado. Para las reacciones de acoplamiento incompleto, los residuos N-terminales que no han reaccionado se protegen terminalmente utilizando un reactivo de protección terminal adecuado.

Tras la reacción de acoplamiento, el soporte de resina se lava para eliminar los Fmoc-aminoácidos y los reactivos de acoplamiento que no habían reaccionado. La resina se somete a continuación a un nuevo ciclo de eliminación catalizada por álcali del grupo Fmoc N-terminal para preparar el polipéptido para otra adición de aminoácidos.

Después de que el polipéptido deseado se ha sintetizado, la resina se somete a eliminación catalizada por álcali del grupo protector Fmoc restante. La resina acoplada a polipéptido se lava para eliminar la base y posteriormente se trata con ácido para eliminar cualquier grupo protector de la cadena lateral de aminoácidos y liberar la cadena polipeptídica del soporte de resina. Los ácidos útiles son ácidos fuertes, tales como ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de captadores adecuados, tales como reactivo K [TFA: tianisol:etanoditiol:fenol:agua (82,5:5:2,5:5:5)].

El polipéptido se separa posteriormente de la resina mediante filtración y opcionalmente se lava repetidamente con un disolvente adecuado, tal como DCM/DMF. El polipéptido se puede desalar opcionalmente a través de ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de PM adecuado. El polipéptido puede ser precipitado de la disolución utilizando un disolvente adecuado, tal como metil t-butil éter o t-butiletileter frío, y el producto precipitado opcionalmente lavado con un disolvente adecuado, tal como éter frío y secado. El polipéptido se puede purificar adicionalmente utilizando un medio de cromatografía adecuado, tal como cromatografía hidrófoba utilizando una resina C18 y un sistema de tampón cromatográfico apropiado, tal como TFA/agua/acetonitrilo. La pureza del péptido opcionalmente se puede analizar por espectrometría de masas, tal como MALDI-MS, HPLC analítica, análisis de aminoácidos o secuenciación.

Alternativamente, los ATC de los SEQ ID NO.: 2, 4, 6, y 8 se pueden expresar de manera recombinante utilizando las secuencias de polinucleótidos de los SEQ ID NO.: 1, 3, 5 y 7 utilizando, por ejemplo, vectores de expresión. En los vectores de expresión, el ADN introducido se conecta operablemente a elementos, tales como promotores, que señalan la célula anfitriona para transcribir el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, tales como los promotores inducibles que controlan la transcripción génica en respuesta a factores específicos. Los ejemplos de los promotores inducibles incluyen aquellos que son específicos de tejido, que relegan la expresión a ciertos tipos de células, sensibles a esteroides (p. ej., glucocorticoides (Kaufman, R. J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511) y tetraciclina o reactivo de choque térmico. Algunos sistemas de represión bacterianos, tales como el operón *lac*, pueden ser explotados en células de mamíferos y animales transgénicos (Fieck, A., et al. 1992. Modifications of the E. coli lac repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res.* 20:1785-91; Wyborski, D. L., L. C. DuCoeur, y J. M. Short. 1996). Parámetros que afectan al uso del sistema represor lac en células eucariotas y animales transgénicos. *Environ Mol Mutagen.* 28:447-58; Wyborski, D. L., y J. M. Short. 1991. Analysis of inducers of the E. coli lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res.* 19:4647-53). Las tecnologías de ácido nucleico recombinante, la transfección a células y la expresión celular *in vitro* se comentan adicionalmente más adelante.

E. Anticuerpos recombinante

Los anticuerpos recombinantes de la presente descripción comprenden regiones de unión a antígeno derivadas de los dominios V_H y/o V_L de un anticuerpo nativo capaces de unirse específicamente a una proteína antigénica de *T. cruzi*. El anticuerpo recombinante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido de manera recombinante, un fragmento de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, una inmunoglobulina, de dominio dual variable multiespecífica (DVD-Ig[®]) o estructura multivalente formada a partir de un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo bifuncional.

En una realización, opcionalmente, el anticuerpo recombinante es un anticuerpo que:

- (1) se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FRA y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $7,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $4,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $5,7 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,3 \times 10^{-7}\text{M}$;
- (b) se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es Pep2 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $6,0 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-8}\text{M}$;
- (c) se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP10 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: (a) una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; (B) una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; y (c) una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-10}\text{M}$ y aproximadamente $1,6 \times 10^{-8}\text{M}$;

- (d) se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un polipéptido de *T. cruzi*, en donde el polipéptido de *T. cruzi* es FP3 y adicionalmente en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre aproximadamente $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y aproximadamente $8,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre aproximadamente $3,3 \times 10^{-12} \text{ M}$ y aproximadamente $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$; y
- (e) cualquier combinación de (a) - (d). En otra realización, opcionalmente, el anticuerpo recombinante es un anticuerpo quimérico que retiene la especificidad y la afinidad del anticuerpo monoclonal de ratón y reacciona en un formato de inmunoanálisis que mide inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo quimérico de ratón-humano se dirige contra el antígeno FP3, FP6, FP10 o FRA. Opcionalmente, tal anticuerpo quimérico reacciona en un formato de inmunoanálisis existente incluyendo, pero no limitado a plataformas AxSYM®, Architect® y PRISM® de Abbott Laboratories.
- La región de unión al antígeno abarcada por el anticuerpo recombinante puede incluir la secuencia de V_H y/o V_L completa del anticuerpo nativo, o puede comprender una o más porciones de la misma, tales como las CDR, junto con secuencias derivadas de uno o más de otros anticuerpos. En una realización, el anticuerpo recombinante comprende secuencias V_H y V_L completas del anticuerpo nativo.
- El anticuerpo nativo del que derivan las regiones de unión al antígeno es generalmente un anticuerpo de vertebrados. Por ejemplo, el anticuerpo nativo puede ser un anticuerpo de roedor (p. ej., ratón, hámster, rata), un anticuerpo de pollo, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo canino, un anticuerpo felino, un anticuerpo bovino, un anticuerpo equino, un anticuerpo porcino, un anticuerpo de simio (p. ej., chimpancé), o un anticuerpo humano. La fuente del anticuerpo se basa principalmente en la conveniencia. En una realización, el anticuerpo natural es un anticuerpo no humano.
- El anticuerpo recombinante también puede incluir una o más regiones constantes, por ejemplo, las regiones C_L , C_H1 , bisagra, C_H2 , C_H3 , y/o C_H4 , derivadas del mismo anticuerpo nativo o de un anticuerpo diferente. La región o las regiones constantes pueden derivar de un anticuerpo de una o varias especies de vertebrados, incluyendo, pero no limitadas a, las enumeradas anteriormente. En una realización, de la presente descripción, el anticuerpo recombinante comprende al menos una región constante. En otra realización, el anticuerpo recombinante comprende una o más regiones constantes que derivan de un anticuerpo humano. En una realización específica de la presente descripción, el anticuerpo recombinante comprende la región variable de un anticuerpo no humano unida a la región constante de un anticuerpo humano.
- La región o las regiones constantes abarcadas por el anticuerpo recombinante pueden derivar de una o más clases de inmunoglobulinas o isotipos, por ejemplo para las regiones constantes derivadas de inmunoglobulinas humanas, la región constante puede derivar de una o más de una región constante de IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 o IgE. Cuando la región constante comprende una región derivada de una cadena ligera de IgG, éste puede derivar de una cadena kappa o una cadena lambda. El anticuerpo recombinante puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. La selección de los dominios constantes concretos para optimizar la función deseada del anticuerpo recombinante se encuentra dentro del conocimiento práctico de la técnica. En una realización, de la presente descripción, el anticuerpo recombinante comprende uno o más dominios constantes derivados de una IgG. En otra realización, el anticuerpo recombinante comprende regiones de las cadenas tanto pesadas como ligeras de un dominio constante de IgG.
- En una realización, de la presente descripción, las regiones de unión a antígeno derivan de un anticuerpo nativo que se une específicamente a un epítipo dentro de una región relevante para el diagnóstico de una proteína antigénica de *T. cruzi*.
- En una realización específica de la presente descripción, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la totalidad o una porción de la secuencia de V_H o V_L como se expone en una cualquiera de los SEQ ID NO.: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 26 o 28 (Véase la Tabla 12 a continuación; Véase la Tabla 11 a continuación para un resumen de los identificadores SEQ ID NO y las correspondientes descripciones de secuencia). En otra realización, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) de una secuencia V_H o V_L .

Tabla 11. Compendio de los SEQ ID NO.: para cadenas V_L y V_H

Antígeno	Línea celular	Polinucleótido V _L	Polipéptido V _L	Polinucleótido V _H	Polipéptido V _H
FP3	HBFP3	9	10	11	12
FP6 (TcF/Pep2)	HBFP2	13	14	15	16
FP10	HBFP10	17	18	19	20
FRA	8-367-171	25	26	27	28

Tabla 12. Secuencias de Polipéptido de V_H y V_L ilustrativas

SEQ ID NO.:	Secuencia	V _H o V _L	ATC
10	YIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MSCSSQSLL NSRTRKNHLA WYQQKPGQSP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFALT ISSVQAEDLA VYFCKQSYNL YTFGAGTKLE LK	V _L	FP3
12	DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS VFGMHVWRQA PEKGLEWVAY ISSGSTIIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNITLF LQMTGLRSED TAMYICARPL YYDYDDYAMD YWGQTSVTV SS	V _H	FP3
14	DIVMSQSPSS LAVSAGEQVT MSCSSQSLLF NSRTRKNYLA WYQQKPGQSP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA VYICKQSYNL LTFGAGTKLE LK	V _L	FP6
16	QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKLR PGQGLEWIGM IDPSDSEYTY DQVFKDKATL TVDKSSSTAY MHLSSLTSED SAVYYCARWI TDSYTMIDYV GQGTSTVTVSS	V _H	FP6
18	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNTYLVHW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP PTFGGGTKLE IK	V _L	FP10
20	QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYWVHWVKQR PGQGLEWIGV IDPSDSYTSY NQKFKGKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCTHY DFDSWYFDVW GAGTTVTVSS	V _H	FP10
26	DIQMDQSPSS LSASLGDTIT ITCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIYK ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISLQP EDIATYYCQQ GQSYPLTFGS GRKLEIK	V _L	FRA
28	EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYMHVVKQR PEQGLEWIGR IDPANGNTKY DPKFQKATI TDTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCATSY YGNYVAYWGH GTLVTVSA	V _H	FRA

En una realización, de la presente descripción, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la totalidad o una porción de la secuencia de aminoácidos codificada por uno cualquiera de los SEQ ID NO.: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 25 o 27 (Véase la Tabla 13, a continuación). En otra realización, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica regiones determinantes de la complementariedad (CDR; *es decir*, CDR1, CDR2 y CDR3) de una secuencia V_H o V_L. En una realización específica, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden las CDR que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a las secuencias de aminoácidos codificadas por uno o más de los SEQ ID NO.: 9 y 11; uno o más de los SEQ ID NO.: 13 y 15; o uno o más de los SEQ ID NO.: 17 y 19; o uno o más de los SEQ ID NO.: 25 o 27 (Véase la Tabla 13, a continuación).

En otra realización específica de la presente descripción, las regiones de unión a antígeno del anticuerpo recombinante comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica a la totalidad o una porción de la secuencia expuesta en uno cualquiera de los SEQ ID NO.: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 25 o 27.

Tabla 13: Secuencias de ácido nucleico ilustrativas que codifican secuencias V_H y V_L

SEQ ID NO.:	Secuencia	V _H o V _L	ATC
9	TACATTGTGA TGTCACAGTC TCCATCCTCC CTGGCTGTGT CAGCAGGAGA GAAGGTCCT ATGAGCTGCA AATCCAGTCA GAGTCTGCTC AACAGTAGAA CCCGAAAGAA CCACTTGGCT TGGTATCAGC AGAAACCAGG GCAGTCTCCT AAAGTCTGA TCTACTGGGC ATCCACTAGG GAATCTGGGG TCCCTGATCG	V _L	FP3
	CTTCACAGGC AGTGGATCTG GGACAGATT CGCTCTCACC ATCAGCAGTG TGCAGGCTGA AGACCTGGCA GTTTATTTCT GCAAGCAATC TTATAATCTG TACACATTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAA		
11	GAIGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGCAGC CTGGAGGGTC CCGGAAACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTTCACT GTCTTTGGAA TGCAGTGGGT TCGTCAGGCT CCAGAGAAGG GGCTGGAGTG GGTCGCATAC ATTAGTAGTG GCAGTACTAT CATCTATTAT GCAGACACAG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ATCCCAAGAA CACCTGTTC CTGCAATGA CCGGTCTAAG GTCTGAGGAC ACGCCATGT ATTACTGTGC AAGACCGCTC TACTATGATT ACGACGACTA TGCTATGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC AGTCACCGTC TCCTCA	V _H	FP3
13	GACATTGTGA TGTCACAGTC TCCATCCTCC CTGGCTGTGT CAGCAGGAGA GCAGGTCCT ATGAGCTGCA AATCCAGTCA GAGTCTGTTC AACAGTAGAA CCCGAAAGAA CTACTTGGCT TGGTACCAGC AGAAACCAGG GCAGTCTCCT AAAGTCTGA TCTACTGGGC ATCCACTAGG GAATCTGGGG TCCCTGATCG CTTCACAGGC AGTGGATCTG GGACAGATT CACTCTCACC ATCAGCAGTG TGCAGGCTGA AGACCTGGCA GTTTATTACT GCAACAATC TTATAATCTG CTCACGTTCT GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAA	V _L	FP6
15		V _H	FP6

SEQ ID NO.:	Secuencia	V _H o V _L	ATC
	CAGGTCCAAC TGCAGCAGCC TGGGGCTGAA CTGGTGAGGC CTGGGGCTTC AGTGAAACTGTCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACC AGCTACTGGA TGAAGTGGGT GAAGTTGAGG CCTGGACAAG GCCTTGAATG GATTGGTATG ATTGATCCTT CAGACAGTGA AACTTACTAC GATCAAGTAT TCAAGGACAA GGCCACATTG ACTGTTGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC ATGCATCTCA GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTACTGTGC AAGATGGATT ACGACTGATT CCTATACTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA CCTCAGTCAC CGTCTCCTCA		
17	GATGTTGTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGGAGA TCAAGCCTCC ATCTCTTGCA GATCTAGTCA GAGCCTTGTA CACAGTAATG GAAACCCTAT TTACATTGGT ACCTGCAGAA GCCAGGCCAG TCTCCAAAGC TCCTGATCTA CAAAGTTTCC AACCgATTTT CTGGGGTCCC AGACAGGTTC	V _L	FP10
	AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTCACA CTCAAGATCA GCAGAGTGA GGCTGAGGAT CTGGGAGTTT ATTTCTGCTC TCAAAGTACA CATGTTCTC CGACGTTCCG TGGAGGCACC AAGCTGGAAA TCAAA		
19	CAGGTCCAAC TGCAGCAGCC TGGGGCTGAG CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGATG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACC AGCTACTGGG TGCACTGGGT GAAGCAGAGG CCTGGACAAG GCCTTGAGTG GATCGGAGTG ATTGATCCTT CTGATAGTTA TACTAGCTAC AATCAAAAGT TCAAGGGCAA GGCCACATTA CTGTAGACAC ATCCTCCAGC ACAGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA TTACTGTACA AGACACTATG ATTTGACAG CTGGTACTTC GATGCTTGGG GCGCAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCA	V _H	FP10
25	gacatccaga tggaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttgggttaa gctggtacca gcagaaacca ggaaatattc ctaaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca aggttttagtg gcagtggatc tggaacagggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaaagt atcctctcac gttcgggtcg gggcgaaagt tggaaataaa a	V _L	FRA
27		V _H	FRA

SEQ ID NO.:	Secuencia	V _H o V _L	ATC
	gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat gaccgaagt tccagggcaa ggccactata acaacagaca catcctcaa cacagcctac ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tacctctac tatggtaact acgttgctta ctggggccac gggactctgg tcaactgtctc tgca		

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo recombinante no tiene que corresponder precisamente a las secuencias parentales, es decir, puede ser una "variante de secuencia." Por ejemplo, dependiendo en los dominios abarcados por el anticuerpo recombinante, una o más de V_L, V_H, C_L, C_H1, bisagra, C_H2, C_H3, y C_H4, según sea el caso, se puede mutagenizar mediante sustitución, inserción o delección de uno o más residuos de aminoácidos de modo que el residuo en ese sitio no se corresponde con cualquiera de la secuencia parental (o de referencia). Un experto en la técnica apreciará, sin embargo, que tales mutaciones no serán importantes y no afectará significativamente a la unión del anticuerpo recombinante con su ATC diana. De acuerdo con la presente descripción, cuando un anticuerpo recombinante comprende una secuencia variante, la secuencia variante es al menos aproximadamente 70% (p. ej., de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En una realización, la variante de secuencia es al menos aproximadamente 75% (p. ej., de aproximadamente 75% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En otras realizaciones, la variante de secuencia es al menos aproximadamente 80% (p. ej., de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 85% (p. ej., de aproximadamente 85% a aproximadamente 100%), o al menos aproximadamente 90% (p. ej., de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En una realización específica, la secuencia de referencia corresponde a una secuencia como la mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO.: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 26 o 28.

Generalmente, cuando el anticuerpo recombinante comprende una secuencia variante que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, estas son sustituciones "conservativas". Una sustitución conservativa implica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo que tiene propiedades de la cadena lateral similares. Como es conocido en la técnica, los veinte aminoácidos de origen natural pueden agruparse según las propiedades fisicoquímicas de sus cadenas laterales. Los agrupamientos adecuados incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano (cadenas laterales hidrófobas); glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina (cadenas laterales no cargadas, polares); ácido aspártico y ácido glutámico (cadenas laterales ácidas) y lisina, arginina e histidina (cadenas laterales alcalinas). Otro grupo de aminoácidos es fenilalanina, triptófano y tirosina (cadenas laterales aromáticas). Una sustitución conservativa implica la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido del mismo grupo.

Por lo tanto, la presente descripción en otras realizaciones proporciona adicionalmente polipéptidos aislados correspondientes a nuevas secuencias de anticuerpos recombinantes descritos en la presente memoria. Opcionalmente, el polipéptido aislado comprende una porción de un anticuerpo recombinante (p. ej., quimérico) que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de un ATC seleccionado del grupo que consiste en FP3, FP6, y FP10. En una realización, el polipéptido comprende una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en una cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 12, 16, 20 o 28. En otra realización más, el polipéptido comprende una región V_H que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad. En otra realización, el polipéptido comprende una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en una cualquiera o más de los SEQ ID NOS.: 10, 14, 18 o 26. En otra realización más, el polipéptido comprende una región V_L que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad.

En otra realización más, el polipéptido comprende una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia codificada por uno cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 11, 15, 19 o 27. En otra realización, el polipéptido comprende una región V_L seleccionada del grupo que consiste en una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia codificada por uno cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 9, 13, 17 o 25.

Del mismo modo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región o regiones variables no tiene que corresponder exactamente a la secuencia de referencia parental pero puede variar en virtud de la degeneración del

código genético y/o de manera que codifique una secuencia de aminoácidos variante como se ha descrito anteriormente. En una realización, de la presente descripción, por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable del anticuerpo recombinante es al menos aproximadamente 70% (p. ej., de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable del anticuerpo recombinante es al menos aproximadamente 75% (p. ej., de aproximadamente 75% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable del anticuerpo recombinante es al menos aproximadamente 80% (p. ej., de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%), al menos aproximadamente 85% (p. ej., de aproximadamente 85% a aproximadamente 100 %), o al menos aproximadamente 90% (p. ej., de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%) idéntica a la secuencia de referencia. En una realización específica, la secuencia de referencia corresponde a una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO.: 9, 11, 13, 15, 17, 19 25 o 27.

Por lo tanto, la presente descripción en otras realizaciones proporciona adicionalmente polinucleótidos aislados que codifican nuevas secuencias de anticuerpos recombinantes, incluyendo secuencias de anticuerpos quiméricos, descritos en la presente memoria. Opcionalmente, el polinucleótido aislado que codifica una porción de un anticuerpo recombinante (p. ej., quimérico) que se une específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi* seleccionada del grupo que consiste en la proteína FP3, FP6 y FP10. En una realización, el polinucleótido codifica una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en una cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 12, 16, 20 o 28. En otra realización, el polinucleótido codifica una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en una cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 10, 14, 18 o 26. En otra realización más, el polinucleótido codifica una región V_L que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad.

En otra realización más, el polinucleótido codifica una región V_H seleccionada del grupo que consiste en una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia codificada por uno cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 9, 13, 17 o 27. En otra realización adicional, el polinucleótido codifica una región V_H que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica una región V_L seleccionada del grupo que consiste en una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia codificada por uno cualquiera o más de los SEQ ID NO.: 11, 15, 19 o 25. En otra realización más, el polinucleótido codifica una región V_L que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad.

En una realización, los anticuerpos se pueden modificar adicionalmente para reducir la inmunogenicidad relativa para un ser humano al anticuerpo nativo mediante la mutación de uno o más aminoácidos en la porción no humana del anticuerpo que son posibles epítomos para células T humanas con el fin de eliminar o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo cuando se expone al sistema inmunológico humano. Las mutaciones adecuadas incluyen, por ejemplo, sustituciones, deleciones e inserciones de uno o más aminoácidos.

En una realización, los anticuerpos recombinantes de la presente descripción pueden modificarse adicionalmente para la inmovilización sobre una fase sólida adecuada. La inmovilización puede lograrse mediante unión covalente o no covalente (por ejemplo, iónica, hidrofóbica, o similares) a la fase sólida. Las modificaciones adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen la adición de un grupo funcional o radical químico ya sea al extremo C-terminal o el extremo N-terminal de una de las secuencias de aminoácidos abarcadas por el anticuerpo recombinante para facilitar el entrecruzamiento o el anclaje del anticuerpo recombinante al soporte sólido. Las modificaciones de ejemplo incluyen la adición de grupos funcionales tales como anhídrido S-acetilmercaptosuccínico (SAMSA) o S-tioacetato de acetilo (SATA), o la adición de uno o más residuos de cisteína a los extremos N o C de la secuencia de aminoácidos. Otros reactivos de entrecruzamiento son conocidos en la técnica, y muchos son asequibles comercialmente (Véanse, por ejemplo, los catálogos de Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois, USA) y Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, USA). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, diaminas, tales como 1,6-diaminohexano; dialdehídos, tales como glutaraldehído; ésteres de bis-N-hidroxisuccinimida, tales como etilenglicol-bis(éster de N-hidroxisuccinimida de ácido succínico), glutarato de disuccinimidilo, suberato de disuccinimidilo, y etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo); diisocianatos, tales como diisocianato de hexametileno; bisoxiranos, tales como 1,4-butanodiil diglicidil éter; ácidos dicarboxílicos, tales como disalicilato de succinilo; éster de ácido 3-maleimidopropiónico de N-hidroxisuccinimida, y similares.

Otras modificaciones incluyen la adición de uno o más aminoácidos en el extremo N terminal o C terminal, tales como residuos de histidina para permitir la unión a superficies derivatizadas con Ni^{2+} , o residuos de cisteína para permitir la formación de puentes disulfuro o unión a agarosa SULFOLINK™. Alternativamente, el anticuerpo puede ser modificado para incluir uno o más espaciadores químicos en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal con el fin de distanciar el anticuerpo recombinante de manera óptima del soporte sólido. Los espaciadores que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, ácido 6-aminohexanoico; 1,3-diaminopropano; 1,3-diaminoetano; y secuencias de aminoácidos cortas, tales como secuencias de poliglicina, de 1 a 5 aminoácidos.

En una realización alternativa, los anticuerpos recombinantes, opcionalmente se pueden conjugar con una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino (BSA), caseína, o tiroglobulina, con el fin de inmovilizarlos sobre una fase sólida.

En otra realización, la presente descripción proporciona la modificación de los anticuerpos recombinantes para incorporar una marca detectable. Las marcas detectables de acuerdo con la descripción preferiblemente son moléculas o radicales que pueden ser detectados directa o indirectamente y se eligen de manera que la conjugación de la marca detectable al anticuerpo recombinante preferiblemente no interfiere en la unión específica del anticuerpo a su proteína de *T. cruzi* diana. Los métodos de marcaje de anticuerpos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de agentes de entrecruzamiento bifuncionales, tales como SAMSA (anhídrido S-acetilmercaptosuccínico), para conectar el anticuerpo recombinante a la marca detectable. Igualmente se pueden utilizar otros reactivos de entrecruzamiento tales como los conocidos en la técnica o que son similares a los descritos anteriormente.

Los marcas detectables para su uso con los anticuerpos recombinantes de la presente descripción incluyen, por ejemplo, las que se puede detectar directamente, tales como radioisótopos, fluoróforos, quimioluminóforos, enzimas, partículas coloidales, micropartículas fluorescentes y similares. La marca detectable es detectable por sí misma o se puede hacer reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Por lo tanto, un experto en la técnica entenderá que las marcas directamente detectables de la descripción pueden requerir componentes adicionales, tales como sustratos, reactivos activadores, luz y similares para permitir la detección de la marca. Los ejemplos de marcas detectables incluyen, pero no se limitan a, cromógenos, radioisótopos (tales como, p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S y ^{14}C), compuestos fluorescentes (tales como fluoresceína, rodamina, tris bipiridil rutenio y derivados quelato de lantánido), compuestos quimioluminiscentes (tales como, p. ej., acridinio y luminol), partículas visibles o fluorescentes, ácidos nucleicos, agentes complejantes, o catalizadores tales como enzimas (tales como, p. ej., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, (3-galactosidasa, β -lactamasa, luciferasa). En el caso del uso de enzimas, la adición de, por ejemplo, un cromosoma, fluoro-, o sustrato luminogénico da como resultado preferiblemente la generación de una señal detectable. Otros sistemas de detección tales como fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de reflexión interna, y espectroscopia Raman son también útiles opcionalmente.

La presente descripción también proporciona el uso de marcas que se detectan indirectamente. Las marcas indirectamente detectables implican típicamente el uso de un "par de afinidad," es decir, dos moléculas diferentes, donde un primer miembro del par está acoplado al anticuerpo recombinante de la presente descripción, y el segundo miembro del par se une específicamente al primer miembro. La unión entre los dos miembros del par suele ser de naturaleza química o física. Los ejemplos de tales pares de unión incluyen, pero no se limitan a: antígenos y anticuerpos; avidina/estreptavidina y biotina; haptenos y anticuerpos específicos para haptenos; secuencias de nucleótidos complementarias; cofactores/sustratos enzimáticos y enzimas; y similares.

F. Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se puede originar en un anfitrión mamífero por medio de una o más inyecciones de un inmunógeno y, si se desea, un coadyuvante. Típicamente, el inmunógeno (y el coadyuvante) es inyectado en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El inmunógeno puede incluir un ATC o un polipéptido fusión de ATC. Los ejemplos de los coadyuvantes incluyen coadyuvante completo de Freund y monofosforil lípido A sintético-dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la respuesta inmunitaria, se puede conjugar un inmunógeno con un polipéptido que sea inmunogénico en el anfitrión, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los protocolos para la producción de anticuerpos son bien conocidos (Ausubel et al., 1987; Harlow, E. y D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 págs.; Harlow, E., and D. Lane. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Alternativamente, los AcPo se pueden elaborar en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade, R., et al. 1996. *The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. 24:925-934).

Los métodos de generar anticuerpos monoclonales contra un antígeno deseado son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden elaborar anticuerpos monoclonales utilizando el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975). En general, en el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de antígeno y un vehículo y/o adyuvante en múltiples sitios. Dos semanas más tarde, los animales reciben un refuerzo, y aproximadamente 7 a 14 días más tarde los animales se desangran y se analiza el suero para determinar el título de anti-antígeno. Los animales pueden ser reforzados hasta mesetas de título.

Los esplenocitos de los ratones se extraen y se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (véanse, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*; págs. 59-103 (Academic Press, 1986); Galfre et al., *Nature*, 266:550 (1977)). Las líneas celulares de mieloma adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y MC-11 (disponible en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA), así como células SP-2, SP2/0 y X63-Ag8-653 (disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA). Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véanse, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Las células de hibridoma preparadas de este modo se pueden sembrar y cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de hibridoma obtenidas a través de tal selección se someten a ensayo a continuación para identificar los clones que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno de *T. cruzi* utilizado en la inmunización inicial, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación o mediante análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o inmunoanálisis enzimático (EIA o ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal opcionalmente se puede determinar, por ejemplo, por medio del análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos de la especificidad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante, por ejemplo el procedimiento descrito por Bastos et al. (*Gastroenterology* 80: 225-232 (1981)), y cultivar mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo, Goding, *idem.*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM, IMDM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar opcionalmente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los Ejemplos 1-4 (Véase, la sección de Ejemplos) ilustran solo una aproximación a la obtención de AcMo contra los ATC encontrados en los polipéptidos FP3, FP6, FP10 y FRA (p. ej., los polipéptidos representados por las secuencias de aminoácidos del SEQ ID NO.: 2, 4, 6 y 8).

G. Preparación de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos recombinantes de la presente descripción pueden comprender secuencias de dominio de unión a antígeno (por ejemplo, secuencias V_H y/o V_L, o una porción de las mismas) derivadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por un ser humano o animal no humano, tal como un roedor, conejo, cánido, felino, bóvido, équido, símio o pollo. Alternativamente, los dominios de unión a antígeno con la actividad de unión deseada se pueden seleccionar mediante el uso de bibliotecas combinatorias expresadas en el fago lambda, en la superficie de bacteriófagos, bacterias o levaduras, o escrutadas mediante presentación en otros sistemas biológicos (por ejemplo, retrovirus o polisoma) o no biológicos utilizando técnicas convencionales (véanse, por ejemplo, Marks, J. D. et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991); Barbas, C. F. III et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4457-4461 (1992)). Las bibliotecas pueden estar compuestas de dominios de unión a antígeno nativos aislados de un anfitrión inmunizado o no inmunizado, dominios de unión a antígenos sintéticos o semi-sintéticos, o dominios de unión a antígenos modificados.

1. Ac recombinantes en general

En una realización de la presente descripción, los anticuerpos recombinantes comprenden dominios de unión a antígeno derivados de anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína de *T. cruzi* de interés.

En una realización de la presente descripción, los anticuerpos recombinantes derivan de anticuerpos monoclonales originados contra un antígeno de *T. cruzi* derivado de una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*. En otra realización, los anticuerpos recombinantes derivan de anticuerpos monoclonales contra a un antígeno de *T. cruzi*, tal como FP3, FP6, o FP10. En otra realización, los anticuerpos recombinantes derivan de anticuerpos monoclonales contra un antígeno de *T. cruzi* que comprende la totalidad o un fragmento (por ejemplo, un fragmento que comprende uno o más epítomos) de FP3, FP6 o FP10. En una realización adicional, los anticuerpos

recombinantes derivan de anticuerpos monoclonales contra un antígeno de *T. cruzi* que comprende una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en uno cualquiera de los SEQ ID NO.: 2, 4 o 6.

5 Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es expresado por una línea celular seleccionada del grupo que consiste en HBFP3, HBFP2, y HBFP10. En una realización alternativa, la línea celular es Chagas 8-367-171.

10 Una vez que se ha preparado un anticuerpo monoclonal, el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal o las regiones variables de los mismos se puede aislar fácilmente por medio de técnicas convencionales, por ejemplo mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras o las regiones variables del anticuerpo monoclonal, o mediante RT-PCR del ARNm que codifica el anticuerpo monoclonal utilizando cebadores para regiones conservadas (por ejemplo, los conjuntos de cebadores de IgG disponibles de Novagen (EMD Biosciences, Inc.), San Diego, California, USA).

15 Una vez aislado, el ADN se puede clonar, por ejemplo, en un vector de expresión apropiado e introducir en una célula anfitriona adecuada, tal como células de *E. Coli*, células de levadura, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK) (por ejemplo, HEK 293), o células de mieloma que por otra parte no producen la proteína inmunoglobulina, con el fin de producir anticuerpos monoclonales recombinantes. Opcionalmente, en una realización, los anti-anticuerpos quiméricos de ratón-humano de *T. cruzi* de la descripción se producen en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), que es ventajosa ya que se pueden producir en cantidades suficientes para uso comercial. Preferiblemente, las células anfitrionas de mamífero son líneas celulares CHO y líneas celulares HEK 293. Otra célula anfitriona preferida es la línea celular B3.2 (p. ej., Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA), u otra línea celular CHO deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (por ejemplo, disponible de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

25 Alternativamente, el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal o las regiones variables del mismo se pueden utilizar para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos mediante métodos convencionales conocidos en la técnica.

30 Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales quiméricos se pueden producir mediante la clonación del ADN que codifica las regiones variables del anticuerpo monoclonal en el vector o los vectores de expresión de mamífero que contienen los genes de la región constante de cadena pesada y ligera del anticuerpo derivados de una especie anfitriona diferente. Muchos vectores de expresión de anticuerpos eucarióticos que están integrados de forma estable o existen en forma de elementos extracromosómicos se han descrito y son conocidos por los expertos normales en la técnica. En general, los vectores de expresión de anticuerpos son plásmidos que comprenden el gen que codifica la región constante de cadena pesada y/o el gen que codifica la región constante de cadena ligera, un elemento intensificador aguas arriba y un promotor adecuado.

40 En la presente descripción se puede utilizar una amplia variedad de secuencias de control de expresión. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen las secuencias control de la expresión asociadas con genes estructurales de los vectores de expresión anteriores así como cualquier secuencia conocida para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de las mismas. Los ejemplos de las secuencias de control adecuadas para dirigir la transcripción en células de mamífero incluyen los promotores temprano y tardío de SV40 y adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor MT-1 (gen de la metalotioneína), el promotor del gen inmediato temprano de citomegalovirus humano (CMV), el promotor del factor 1 α de elongación humano (EF-1 α), el promotor mínimo de la proteína de choque térmico 70 de *Drosophila*, el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor de la ubiquitina C humana (UBC), el terminador de la hormona de crecimiento humana, las señales de poliadenilación de SV40 o de la región Elb de adenovirus y la secuencia consenso de Kozak (Kozak, J Mol Biol., 196:947-50 (1987)).

50 Por ejemplo, para las regiones constantes humanas, el vector de expresión del anticuerpo puede comprender los genes de IgG1 humana (C γ 1 humana) y de la región constante kappa humana (C κ humana) y el elemento intensificador de cadena H de inmunoglobulina. El vector también puede contener un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección. La inclusión opcional de un marcador de selección, como se conoce en la técnica, permite la selección y amplificación en condiciones de crecimiento definidas, por ejemplo el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) proporciona la selección y amplificación en células de mamífero con metotrexato. La construcción de un vector apropiado para la expresión de anticuerpos a partir de un vector de expresión de mamíferos comercial, puede ser lograda fácilmente por el técnico experto. Según se describe en la presente memoria se pueden emplear diversos vectores incluyendo vectores PBV, PJV, y OBP, así como una variedad de vectores y plásmidos intermedios para la producción de anticuerpos. Los vectores PBV, PJV y OBP fueron adquiridos de Abbott Bioresearch Center (Worcester, MA). Otros plásmidos y vectores similares están disponibles en el mercado y/o se construyen fácilmente.

La introducción del constructo o los constructos de expresión en células anfitrionas apropiadas da como resultado la producción de anticuerpos quiméricos completos de una especificidad definida (véase, por ejemplo, Morrison, S. L.

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). Las secuencias codificantes de cadena pesada y ligera se pueden introducir en la célula anfitriona de forma individual en plásmidos separados o conjuntamente en el mismo vector.

Dependiendo del sistema de vector utilizado, muchas líneas celulares inmortalizadas diferentes pueden servir como anfitriones adecuados, éstas incluyen, pero no se limitan a, mieloma (por ejemplo, X63-Ag8.653), hibridoma (por ejemplo, Sp2/0-Ag14), linfoma, células de insecto (por ejemplo, células Sf9), células embrionarias humanas de riñón (por ejemplo, HEK 293) y células de ovario de hámster chino (CHO). Los constructos de expresión pueden introducirse en las células anfitrionas utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, precipitación con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, lipofección, vectores lanzadera derivados de retrovirus y electroporación.

También se pueden producir anticuerpos quiméricos y fragmentos de anticuerpos en otros sistemas de expresión, incluyendo, pero no limitados a, baculovirus, levaduras, bacterias (tales como *E. coli*), y sistemas libres de células *in vitro*, tales como producto lisado de reticulocitos de conejo.

El anticuerpo recombinante puede aislarse de las células anfitrionas por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad, o combinaciones de los mismos.

Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos se pueden generar a partir de una preparación de anticuerpo purificado por métodos enzimáticos convencionales, por ejemplo, se pueden producir fragmentos $F(ab')_2$ mediante escisión con pepsina del anticuerpo intacto, y se pueden producir fragmentos Fab digiriendo brevemente el anticuerpo intacto con papaina.

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos y heteroconjugados recombinantes que tienen especificidades para al menos dos antígenos diferentes en forma de anticuerpos completos o en forma de fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos de anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). También se contemplan fragmentos de anticuerpo que tienen más de dos valencias (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos trivalentes o de valencia superior). Los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos heteroconjugados, y los anticuerpos multivalentes se pueden preparar por medio de métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

2. Ac Monovalentes

Los Ac monovalentes no se entrecruzan entre sí. Un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de Ig y la cadena pesada modificada. Los truncamientos de la cadena pesada generalmente en cualquier punto en la región Fc de la cadena pesada evitan el entrecruzamiento. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan, previniendo el entrecruzamiento por enlaces disulfuro. Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. Los Ac pueden ser digeridos para producir fragmentos, tales como Fab (Harlow y Lane, 1988, *supra*; Harlow y Lane, 1999, *supra*).

3. Ac humanizados y humanos

Las formas humanizadas de los Ac no humanos que se unen un ATC son Ig quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los Ac) que contienen una secuencia mínima derivada de Ig no humana.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son referidos a menudo como residuos "importados" que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se lleva a cabo mediante la sustitución de las CDR de roedores o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones, P. T., et al. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 321:522-5; Riechmann, L., et al. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 332:323-7; Verhoeven, M., et al. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science*. 239:1534-6). Tales Ac "humanizados" son Ac quiméricos (Cabilly *et al.*, 1989), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los Ac humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en el Ac de roedor. Los Ac humanizados incluyen Ig humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes reemplazan los residuos del marco Fv de la Ig humana. Los Ac humanizados puede incluir residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias

CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado contiene sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la mayoría si no todas las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana, y la mayoría si no todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprende por lo menos una porción de una región constante de Ig (Fc), típicamente la de una Ig humana (Jones *et al.*, 1986; Presta, 1992; Riechmann *et al.*, 1988).

Los Ac humanas también se pueden producir utilizando diversas técnicas, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom, H. R., et al. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:4133-7; Marks, J.D., et al. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 222:581-97) y AcMo humanos (Boerner, P., et al. 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol.* 147:86-95; Reisfeld, R.A., and S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 1985. Alan R. Liss, New York. 609 págs). La introducción de genes de Ig humanos en animales transgénicos en los que los genes de Ig endógenos han sido parcial o completamente inactivados puede ser explotada para sintetizar Ac humanos. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos (Fishwild, D. M., et al. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 14:845-51; Lonberg y Huszar, 1995; Lonberg *et al.*, 1994; Marks *et al.*, 1992; Lonberg, N., y R.M. Kay. Patente de los Estados Unidos Núm. 5569825. 1996; Lonberg, N., y R.M. Kay. Patente de los Estados Unidos Núm. 5633425. 1997a; Lonberg, N., y R.M. Kay. Patente de los Estados Unidos Núm. 5661016. 1997b; Lonberg, N., y R.M. Kay. Patente de los Estados Unidos Núm. 5625126. 1997c; Surani, A., et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5545807. 1996).

3. Ac biespecíficos

Los AcMo biespecíficos unen al menos a dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una especificidad de unión es un ATC; la otra es para cualquier antígeno de elección.

La producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se realiza generalmente mediante co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de Ig, cada uno con diferentes especificidades. El distribución aleatoria de estas cadenas pesadas y ligeras de Ig en los hibridomas resultantes (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura bi-específica deseado. El anticuerpo deseado se puede purificar utilizando cromatografía de afinidad u otras técnicas (Traunecker, A., et al. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9:109-13; Wabl, M., J. Berg, y E. Lotscher. Documento WO 93/08829. 1993).

Para fabricar un anticuerpo biespecífico, los dominios variables con los sitios de combinación anticuerpo-antígeno deseados se fusionan a secuencias del dominio constante de Ig (Suresh, M. R., A. C. Cuello, y C. Milstein. 1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* 121:210-28). La fusión es usualmente con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. La primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de Ig de cadena pesada y, si se desea, la cadena ligera de Ig, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan a un organismo anfitrión adecuado.

La interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes (Carter, P., L. et al. Documento WO 96/27011. 1996). En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se rempazan por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo remplazando las cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Este mecanismo aumenta el rendimiento del heterodímero sobre productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los Ac biespecíficos se puede preparar como Ac completas o fragmentos de anticuerpos (p. ej., Ac Fab'₂ biespecíficos). Una de las técnicas para generar Ac biespecíficos explota el enlace químico. Los Ac intactos se pueden escindir proteolíticamente para generar fragmentos Fab'₂ (Brennan, M., et al. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science.* 229:81-3). Los fragmentos se reducen con un agente complejante de ditiol, tales como arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. Coli* y acoplar químicamente para formar Ac biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir Ac Fab'₂ biespecíficos totalmente humanizados (Shalaby, M. R., et al. 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 175:217-25). Cada fragmento Fab' se secreta separadamente a partir de *E. Coli* y se acoplado directamente químicamente *in vitro*, formando el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se pueden explotar los motivos de cremallera de leucina (Kostelny, S.A., et al. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-53). Los péptidos de los polipéptidos Fos y Jun se ligan a las porciones Fab' de dos Ac diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se vuelven a oxidar para formar heterodímeros de anticuerpo. Este método puede también producir homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" proporciona un método alternativo para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (Holliger *et al.*, 1993). Los fragmentos consisten en una cadena pesada V_H conectada a una cadena ligera V_L mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos es el uso de dímeros Fv (sFv) de cadena sencilla (Gruber, M., et al. 1994. Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol.* 152:5368-74). También se pueden preparar Ac con más de dos valencias, por ejemplo en forma de Ac tri-específicos (Tutt, A., et al. 1991. Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol.* 147:60-9). Los Ac biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítomos diferentes en una ATC dada.

H. Ensayos de anticuerpos recombinantes

La capacidad del anticuerpo recombinante para unirse específicamente al antígeno de *T. cruzi* diana se puede evaluar mediante técnicas inmunológicas convencionales (véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Coligan, J.E., et al. (ed.), J. Wiley & Sons, Nueva York, NY). Por ejemplo, mediante radioinmunoanálisis (RIA) o inmunoanálisis enzimático (EIA o ELISA). En una realización de la presente descripción, el anticuerpo recombinante demuestra sustancialmente la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal a partir del cual derivan los dominios de unión a antígeno.

Los anticuerpos recombinantes, opcionalmente, también pueden ser sometidos a ensayo por su afinidad de unión al antígeno de *T. cruzi* diana mediante la medición de la constante de disociación en equilibrio (K_D) por técnicas convencionales. En una realización de la presente descripción, los anticuerpos recombinantes (p. ej., anticuerpos quiméricos) tienen una K_D menor de aproximadamente 1 μM. En otra realización, los anticuerpos recombinantes (p. ej., anticuerpos quiméricos) tienen una K_D menor de aproximadamente 100 nM.

También se puede realizar otras pruebas convencionales sobre los anticuerpos, por ejemplo, se puede obtener el valor pI de los anticuerpos.

Opcionalmente, los anticuerpos recombinantes (p. ej., anticuerpos quiméricos) se someten a procedimientos de mapeo epitópico para identificar la región del antígeno diana a la que se unen. Una variedad de métodos de mapeo epitópico son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Coligan, J.E., et al. (Ed.), J. Wiley & Sons, Nueva York, NY) e incluyen, por ejemplo métodos de presentación en fagos y levaduras. Los métodos de presentación en fagos y levaduras también pueden combinarse con técnicas de mutagénesis al azar con el fin de mapear con mayor precisión los residuos del antígeno diana implicados en la unión del anticuerpo (véase, por ejemplo, Chao, G., et al., *J. Mol. Biol.*, 10: 539-50 (2004)).

En una realización de la presente descripción, los residuos del antígeno diana al que se unen los anticuerpos recombinantes se identifican por una técnica que combina la mutagénesis por barrido de alanina con la presentación en levadura. La técnica implica generalmente la preparación de una serie de oligonucleótidos que codifican péptidos representando cada uno la región diana del antígeno y en el que cada aminoácido individual en esta región se sustituye por alanina secuencialmente. La región diana del antígeno se determina ya sea a partir del antígeno utilizado en la inmunización inicial para preparar el anticuerpo monoclonal parental, o a partir de un escrutinio "de baja resolución" preliminar utilizando presentación en levadura o en fagos. Una versión de tipo salvaje del antígeno se utiliza como control. Cada oligonucleótido se clona en un vector de presentación en levadura apropiado y cada mutante para alanina se transforma en un anfitrión adecuado, tal como *E. Coli*. El ADN del plásmido se extrae y se secuencian y los clones se seleccionan basándose en la secuenciación. Los vectores de presentación en levadura son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado (por ejemplo, pYD1 disponible de Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA).

Los clones seleccionados se transforman en células de *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, células EBY100 (Invitrogen Corp.), y los clones de levadura individuales se cultivan y se induce la expresión de péptidos. Las células de levadura inducidas que expresan los mutantes de alanina en la superficie celular se incuban con el anticuerpo recombinante y el anticuerpo unido se detecta por métodos convencionales, por ejemplo utilizando un anticuerpo secundario marcado. Los residuos clave en la región antigénica diana se pueden determinar sobre la base de la identificación de mutantes de alanina incapaces de unirse al anticuerpo recombinante. Una pérdida de actividad de unión del anticuerpo indica que el mutante incluye un residuo de alanina en una posición que forma parte del epítipo para el anticuerpo recombinante.

I. Usos de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos recombinantes de la presente descripción son adecuados para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico para la detección de *T. cruzi*, y/o como reactivos de normalización, reactivos de control positivo o reactivos calibradores en análisis o kits para la detección de anticuerpos de *T. cruzi* en lugar del plasma o suero tradicionales. Los reactivos de normalización se pueden utilizar, por ejemplo, para establecer las curvas de calibración para la interpolación de la concentración de anticuerpo. Los controles positivos se pueden utilizar para establecer las características de rendimiento del análisis y/o cuantificar y controlar la integridad del antígeno o de los antígenos utilizados en el análisis. La presente descripción también proporciona el uso de una pluralidad de los anticuerpos recombinantes, cada anticuerpo recombinante capaz de unirse específicamente a un antígeno de *T. cruzi* diferente, como paneles de sensibilidad a anticuerpos normalizados. Tales paneles de sensibilidad se pueden utilizar, por ejemplo, en lugar del plasma o el suero tradicionales para el control de calidad de kits de detección de anticuerpos *T. cruzi*, para establecer las características de rendimiento del análisis y/o cuantificar y controlar la integridad del antígeno o de los antígenos utilizados en el análisis. La presente descripción también contempla el uso de los anticuerpos recombinantes en el tratamiento o prevención de una infección por *T. cruzi*.

Una realización de la presente descripción proporciona de este modo un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a una región relevante para el diagnóstico de una proteína de *T. cruzi*.

En una realización de la presente descripción, el reactivo de inmunodiagnóstico comprende una pluralidad de (por ejemplo, dos o más) anticuerpos recombinantes cada uno capaz de detectar un antígeno de *T. cruzi* diferente.

El reactivo de inmunodiagnóstico se puede adaptar para un uso final específico mediante la selección apropiada de los anticuerpos recombinantes que lo componen, haciendo así el reactivo de inmunodiagnóstico compatible con diversos formatos de análisis y kits para la detección de *T. cruzi* existentes. La adaptación del reactivo de inmunodiagnóstico de esta manera también permite optimizar el reactivo para la detección de ciertas etapas de infección por *T. cruzi*.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de normalización de los análisis de detección de anticuerpos *T. cruzi* utilizando un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende una pluralidad de anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a un ATC diferente, como un panel de sensibilidad.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para detectar la presencia de ATC que comprende poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de contener los ATC con un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente al ATC, en condiciones que permiten la formación de complejos de anticuerpo recombinante:antígeno y detectar cualquier complejo de anticuerpo recombinante:antígeno formado.

La presente descripción también abarca un método para detectar la presencia de anticuerpos de *T. cruzi* que comprende poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de contener anticuerpos de *T. cruzi* con uno o más antígenos específicos para los anticuerpos de *T. cruzi*, en condiciones que permiten la formación de complejos de antígeno/anticuerpo, la detección de complejos de antígeno:anticuerpo, y el uso de reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos recombinantes, cada uno capaz de unirse específicamente a uno de los antígenos utilizados en el método, como control positivo o reactivo de normalización.

Los reactivos de inmunodiagnóstico de la presente descripción son adecuados para su uso con análisis y kits de control de las respuestas de *T. cruzi* en el hombre, así como otras especies de vertebrados susceptibles de infección por *T. cruzi* y capaces de generar una respuesta de anticuerpos al mismo. De este modo, los reactivos de inmunodiagnóstico tienen aplicaciones en medicina humana, así como veterinaria.

La presente descripción también abarca el uso de los anticuerpos recombinantes y las regiones variables descritas en la presente memoria en las tecnologías de evolución molecular dirigida, tales como tecnologías de presentación en fagos, y tecnologías de presentación en células bacterianas y de levadura, con el fin de producir anticuerpos

recombinantes novedosos *in vitro* (Véase, por ejemplo, Johnson et al., Current Opinion in Structural Biology. 3: 564 (1993) y Clackson et al, Nature 352: 624 (1991)).

Opcionalmente, el reactivo de inmunodiagnóstico de la descripción, p. ej., los anticuerpos quiméricos, se pueden utilizar en inmunoanálisis de plataformas comerciales.

J. Kits que comprenden anticuerpos recombinantes

La presente descripción proporciona adicionalmente kits terapéuticos, de diagnóstico y de control de calidad que comprenden uno o más anticuerpos recombinantes de la descripción.

Un aspecto de la presente descripción proporciona kits de diagnóstico para la detección de *T. cruzi*. Los kits comprenden uno o más anticuerpos recombinantes de la presente descripción. Los anticuerpos recombinantes se pueden proporcionar en el kit como reactivos de detección, ya sea para su uso para capturar y/o detectar antígenos de *T. cruzi* o para su uso como anticuerpos secundarios para la detección de complejos de antígeno:anticuerpo. Alternativamente, los anticuerpos recombinantes se pueden proporcionar en el kit como un reactivo de control positivo, un reactivo de normalización, un reactivo de calibración o un panel de sensibilidad. En diversas realizaciones, el kit de diagnóstico puede comprender adicionalmente reactivos para la detección de antígenos de *T. cruzi* o reactivos para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*. En una realización, la presente descripción proporciona un kit de diagnóstico que comprende reactivos para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*, incluyendo uno o más antígenos específicos para el anticuerpos de *T. cruzi*, y un reactivo de control positivo o de normalización que comprende uno o más anticuerpos recombinantes de la descripción, cada uno capaz de unirse específicamente a uno de los uno o más antígenos incluidos en el kit.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona adicionalmente kits de diagnóstico y de control de calidad que comprenden uno o más anticuerpos de la descripción. Opcionalmente, los análisis, kits y componentes del kit de la descripción están optimizados para su uso en plataformas comerciales (por ejemplo, inmunoanálisis en las plataformas Prism®, AxSYM®, ARCHITECT® y EIA (Cuentas) de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, así como otros análisis de diagnóstico comerciales y/o en *in vitro*). Además, los análisis, kits y componentes del kit se pueden emplear en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de análisis electroquímicos u otros sistemas de análisis manuales o instantáneos. La presente descripción es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoanálisis electroquímico instantáneo de Abbot comercial (i-STAT®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) que realiza inmunoanálisis de tipo sándwich para varios marcadores cardíacos, incluyendo Tnl, CKMB y BNP. Los inmunosensores y métodos de funcionamiento en los dispositivos de ensayo de un solo uso se describen, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. 20030170881, 20040018577, 20050054078 y 20060160164 que se incorporan a la presente memoria como referencia. Los antecedentes adicionales en la fabricación de inmunosensores electroquímicos y otros tipos de inmunosensores se encuentran en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.063.081 que también se incorpora como referencia por sus enseñanzas respecto a los mismos.

Opcionalmente, los kits incluyen reactivos de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). La preparación de los reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica, y se describe, por ejemplo, en una variedad de hojas anexas al producto de inmunodiagnóstico. Los miembros del panel de sensibilidad opcionalmente se pueden preparar en cantidades variables que contienen, por ejemplo, cantidades conocidas de anticuerpo que oscilan de "bajas" a "altas", por ejemplo, por incorporar cantidades conocidas de los anticuerpos de acuerdo con la descripción a un tampón de análisis apropiado (p. ej., un tampón de fosfato). Estos miembros del panel de sensibilidad opcionalmente se utilizan para establecer las características de rendimiento de análisis, y adicionalmente de manera opcional son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoanálisis, y de la normalización de los análisis.

Los anticuerpos suministrados en el kit pueden incorporar una marca detectable, tal como un fluoróforo, radical radiactivo, enzima, marca de biotina/avidina, cromóforo, marcador quimioluminiscente, o similar, o el kit puede incluir reactivos para marcar los anticuerpos o reactivos para detectar los anticuerpos (p. ej., anticuerpos de detección) y/o para marcar los antígenos o reactivos para detectar el antígeno. Los anticuerpos, calibradores y/o controles se pueden proporcionar en recipientes separados o pre-dispensar en un formato de análisis apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Los kits pueden incluir opcionalmente otros reactivos necesarios para llevar a cabo un análisis de diagnóstico o facilitar las evaluaciones de control de calidad, tales como tampones, sales, enzimas, cofactores de enzimas, sustratos, reactivos de detección, y similares. También se pueden incluir en el kit otros componentes, tales como tampones y disoluciones para el aislamiento y/o el tratamiento de una muestra de análisis (por ejemplo, reactivos de pretratamiento). El kit puede incluir adicionalmente uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit se pueden liofilizar y el kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit opcionalmente se proporcionan en recipientes adecuados. Como se indicó anteriormente, uno o más de los recipientes puede ser una placa de microtitulación. El kit puede incluir adicionalmente recipientes para contener o almacenar una muestra (por ejemplo, un recipiente o cartucho para una muestra de sangre o de orina). En su caso, el kit también puede contener opcionalmente recipientes de reacción, recipientes de mezcla y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de ensayo. El kit también puede incluir uno o más instrumentos de ayuda para la obtención de una muestra de ensayo, tal como una jeringa, pipeta, fórceps, cuchara de medida, o similares.

El kit además puede incluir opcionalmente instrucciones de uso, que se pueden ofrecer en papel o en soporte informático, como un disco, CD, DVD o similares.

K. Adaptación de los kits

El kit (o los componentes del mismo), así como el método de determinar la detección de la presencia o concentración de los antígenos de *T. cruzi* en una muestra de análisis mediante un análisis utilizando los componentes y métodos descritos en la presente memoria, se pueden adaptar para su uso en una variedad de sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en los que la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.089.424 y 5.006.309, y comercializados, p. ej., por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semi-automatizado en comparación con un sistema no automatizado (p. ej., ELISA) incluyen el sustrato al que se une el primer par de unión específica (p. ej., el anticuerpo de captura de *T. cruzi*) (que puede afectar la formación de sándwich y a la reactividad del analito), y la longitud y el momento de la captura, la detección y/o cualquier etapa de lavado opcional. Considerando que un formato no automatizado tal como un ELISA puede requerir un tiempo relativamente más largo de incubación con la muestra y el reactivo de captura (por ejemplo, aproximadamente 2 horas) un formato automatizado o semi-automatizado (p. ej., ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo relativamente más corto de incubación (p. ej., aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT®). Del mismo modo, mientras que un formato no automatizado tal como un ELISA puede incubarse un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado durante un tiempo de incubación relativamente más largo (p. ej., aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o semi-automatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente corto (p. ej., aproximadamente 4 minutos para ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, pero no se limitan a, AxSYM®, IMx® (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.294.404, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad), PRISM®, EIA (cuentas), y Quantum™ II, así como otras plataformas. Además, los análisis, kits y componentes del kit se pueden emplear en otros formatos, por ejemplo, en electroquímicos u otros sistemas de análisis manuales o instantáneos. La presente descripción es, por ejemplo, aplicable al sistema de inmunoanálisis electroquímico instantáneo de Abbott comercial (i-STAT®, Abbott Laboratories) que realiza inmunoanálisis de tipo sándwich. Los inmunosensores y sus métodos de fabricación y el funcionamiento de los dispositivos de ensayo de un solo uso se describen, por ejemplo, en, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.063.081, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003/0170881, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0018577, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2005/0054078, y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2006/0160164, que se incorporan en su totalidad como referencia por sus enseñanzas respecto a los mismos.

En particular, con respecto a la adaptación de un análisis de antígeno de *T. cruzi* al sistema I-STAT®, se prefiere la siguiente configuración. Se elabora un chip de silicio microfabricado con un par de electrodos de trabajo amperométricos de oro y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata. En uno de los electrodos de trabajo, se adhieren cuentas de poliestireno (0,2 mm de diámetro) con anticuerpo de captura inmovilizado a un recubrimiento polimérico de poli(alcohol vinílico) sobre el electrodo. Este chip se ensambla en un cartucho de I-STAT® con un formato de fluidos adecuado para inmunoanálisis. En una porción de la pared de la cámara que contiene la muestra del cartucho hay una capa que comprende el segundo anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina (u otra marca). Dentro de la bolsa de fluido del cartucho hay un reactivo acuoso que incluye fosfato de p-aminofenol.

En funcionamiento, una muestra sospechosa de contener un antígeno de *T. cruzi* se añade a la cámara contenedora del cartucho de prueba y el cartucho se inserta en el lector de I-STAT®. Después de que el segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) se ha disuelto en la muestra, un elemento de bomba dentro del cartucho obliga a la muestra a un conducto que contiene el chip, aquí se hace oscilar para promover la formación del sándwich entre la antígeno de *T. cruzi*, el anticuerpo de captura de *T. cruzi*, y el anticuerpo de detección marcado. En la penúltima etapa del análisis, el fluido es forzado a salir de la bolsa y al conducto para lavar la muestra fuera del chip y a una cámara de residuos. En la etapa final del análisis, la marca de fosfatasa alcalina reacciona con fosfato de p-aminofenol para escindir el grupo fosfato y permitir la liberación de p-aminofenol que se oxida electroquímicamente en el electrodo de trabajo. Basándose en la corriente medida, el lector es capaz de calcular la cantidad de antígeno

de *T. cruzi* en la muestra por medio de un algoritmo implementado y una curva de calibración determinada en la fábrica.

No es necesario decir que los métodos y kits descritos en la presente memoria incluyen necesariamente otros reactivos y métodos para llevar a cabo el inmunoanálisis. Por ejemplo, están incluidos varios tampones tales como los que son conocidos en la técnica y/o que se pueden preparar fácilmente u optimizar para ser empleados, p. ej., para el lavado, en forma de un diluyente de producto conjugado, y/o en forma de un diluyente calibrador. Un diluyente de producto conjugado ilustrativo es el diluyente de producto conjugado ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), una sal, un bloqueador de proteína, un agente antimicrobiano, y un detergente. Un diluyente calibrador ejemplar es diluyente calibrador humano ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprende un tampón que contenía MES, otra sal, un bloqueador de proteína, y un agente antimicrobiano

Para obtener una mejor comprensión de la descripción descrita en la presente memoria, se exponen los siguientes ejemplos. Se entenderá que estos ejemplos están destinados a describir realizaciones ilustrativas de la descripción y no pretenden limitar el alcance de la descripción de ninguna manera.

En los siguientes ejemplos, los anticuerpos contra el antígeno FP3 de *T. cruzi* de los Ejemplos 1 y 5 son anticuerpos de la invención. Otros anticuerpos ilustrados se presentan con fines comparativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Líneas celulares que producen anticuerpos contra antígeno FP3 de *T. cruzi* (Chagas FP3 12-392-150-110)

En este ejemplo, se produjo una línea celular de hibridoma que producía AcMo que reconocía y se unía a antígeno recombinante FP3 de Chagas. Los ratones se inmunizaron con el antígeno recombinante FP3 (SEQ ID NO.: 2), los ratones que producían anticuerpo anti-FP3 se sacrificaron, las células del bazo se cosecharon y se fusionaron con células de mieloma, y líneas celulares de hibridoma AcMo anti-FP3 se aislaron. Se produjo la línea celular HBFP3 resultante.

Preparación de inmunógeno

La línea celular de antígeno FP3 de Chagas fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Louis Kirchoff de la Universidad de Iowa, para un banco de semillas en el Condado de Lake, Illinois. La secuencia de ADNc que codificaba este antígeno (SEQ ID NO.: 1) se clonó en los vectores de expresión pET bajo el control del promotor T7 y se expresaron en células anfitrionas de *E. coli* adecuadas [BLR(DE3)pLysS o BL21(DE3)]. La ARN polimerasa de T7 fue codificada por lisógeno lambda DE3 insertado en el genoma bacteriano anfitrión y bajo el control del promotor lacUV5. Se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a las células para inducir la expresión de la ARN polimerasa de T7, que a su vez se unió al promotor T7 y dio como resultado la expresión del gen clonado. Las placas de las células transformadas se sembraron en estrías para aislar una única colonia y se prepararon bancos de células. Con posterioridad, se hizo crecer *E. coli*, y se preparó una pasta de células para la purificación.

En primer lugar, se purificó el antígeno FP3 recombinante a partir de sobrenadante aclarado haciendo circular el sobrenadante aclarado durante la carga. En segundo lugar, los contaminantes falsamente unidos fueron eliminados de la columna de Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC) mediante lavado de la columna de afinidad con un tampón de alta concentración de sal. En tercer lugar, el polipéptido FP3 recombinante (extremo amino) etiquetado con His se hizo eluir de la columna mediante la eliminación competitiva del antígeno etiquetado con His con imidazol. Con posterioridad, las proteínas eluidas se fraccionaron y se analizaron por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las fracciones que contenían el antígeno FP3 recombinante sin contaminación significativa se combinaron y se concentraron. Después de la concentración, el antígeno FP3 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna de dimensionamiento Sephacryl S-300 de 2000 ml, se analizó mediante SDS-PAGE y se concentró.

Inmunización de animales

Ratones RBF/DNJ hembra (todos los ratones se obtuvieron de Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME) se inmunizaron dos veces con antígeno recombinante FP4 de Chagas purificado (que contenía la secuencia de FP3 diana) y una vez con antígeno recombinante FP3 de Chagas purificado, utilizando el Sistema Coadyuvante de Freund, antes de la comprobación de los antisueros para determinar un título suficiente. El inóculo se preparó diluyendo el antígeno en cloruro de sodio al 0,9% y emulsionando con un volumen igual de coadyuvante. En las semanas 0 y 3, se administró un refuerzo de 20 µg de FP4 (que contenía la secuencia de FP3 diana) a los ratones. En la semana 6, se administró un refuerzo de 10 µg de FP3 a los ratones. Se utilizó Coadyuvante Completo de Freund para el refuerzo primario liberado por vía subcutánea, y se utilizó Coadyuvante Incompleto de Freund para

los próximos 2 refuerzos intradérmicos. Dos semanas después del tercer refuerzo, se tomó una muestra de suero para un ensayo de titulación específico de anti-*T. cruzi*, que dio como resultado resultó la selección del ratón núm. 241 para el experimento de fusión. Tres días antes de la fusión, se administró al ratón núm. 241 un refuerzo pre-fusión de 5 µg de antígeno FP3 recombinante.

5

Creación de hibridoma (experimento de fusión celular)

Los hibridomas se desarrollaron utilizando la técnica de fusión mediada por polietilenglicol (PEG) descrita en Galfre *et al.* (Galfre, G., et al. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*. 266: 550-2). El ratón RBF/DNJ núm. 241 fue sacrificado tres días después del refuerzo pre-fusión, y el bazo se cosechó. Las células B fueron perfundidas del bazo, lavaron y se re-suspendieron en un número igual de células de mieloma SP2/0 (Depósito ATTC CRL-1581). Las células totales se sedimentaron, y la fusión se realizó con 1 ml de polietilenglicol (PEG) y se cultivaron a 37°C en medio Libre de Suero de Hibridoma GIBCO® con suplemento de HAT (H-SFM; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10% (FBS; Hyclone; Logan, UT). Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C. Los híbridos se sometieron a ensayo 10-14 días más tarde para determinar la reactividad anti-FP3 de *T. cruzi* en un inmunoanálisis enzimático de microtitulación (EIA). Los resultados indicaron el anticuerpo específico anti-FP3 secretado 12-392 híbrido.

Clonación y subclonación de hibridoma

Se seleccionó el hibridoma 12-392 para la clonación por dilución limitante. Las células se suspendieron y luego se diluyeron en serie 10^4 , 10^5 y 10^6 en 20 ml de H-SFM con FBS al 10%. Cada dilución se sembró en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de suspensión de células por pocillo. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-FP3 que dio como resultado la selección de clon 12-392-150.

El clon 12-392-150 se seleccionó para la subclonación utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se coloreó una suspensión celular con Alexa Fluor 488 anti-ratón de cabra (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Los productos aislados de una sola célula del 5-8% superior de esta población de células teñidas se depositaron sobre una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de H-SFM con FBS al 10%. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-FP3 que dio como resultado la selección de clon 12-392-150-110 (HBFP3).

Se expandió el HBFP3 del cultivo de tejido a una botella de cultivo rotatoria de 850 cm², pase celular 5, en H-SFM con FBS al 10%. La suspensión celular del pase 5 se sedimentó, se resuspendió en medio de congelación y se dispensó en crioviales. Los viales se almacenaron en los tanques de almacenamiento de nitrógeno líquido.

Ejemplo 2: Líneas celulares productoras de anticuerpos contra antígeno recombinante TcF de Chagas (Chagas 9-638-132-115)

Fuente de inmunógeno

El antígeno recombinante TcF purificado (que contiene la secuencia de PEP2) utilizado para las inmunizaciones de los animales se obtuvo de Corixa Corporation (Seattle, WA).

Inmunización de animales

Se inmunizaron ratones hembra RBf/dnJ tres veces con antígeno recombinante TcF de Chagas purificado, usando el Sistema Coadyuvante de Freund, antes de la comprobación de los antisueros para un título suficiente. El inóculo se preparó diluyendo el antígeno de cloruro de sodio al 0,9% y emulsionando con un volumen igual de coadyuvante. En las semanas 0, 6, y 12, se administró a los ratones un refuerzo 20 µg de TcF. Se utilizó Coadyuvante de Freund completo para el refuerzo primario administrado por vía subcutánea y se utilizó Coadyuvante de Freund incompleto para los siguientes 2 refuerzos intradérmicos. Dos semanas después del tercera refuerzo, se tomó una muestra de suero para un ensayo de titulación anti-*T. cruzi* específico, que dio como resultado la selección de ratón núm. 115 para el experimento de fusión. Tres días antes de la fusión, se administró al ratón núm. 15 un refuerzo pre-fusión de 10 µg de antígeno TcF recombinante y 10 µg del péptido TcF Pep2.

Creación de hibridoma

Los hibridomas se desarrollaron utilizando la técnica de la fusión mediada por PEG descrita por Galfre *et al.* (Galfre *et al.*, 1977). El ratón RBf/dnJ núm. 115 fue sacrificado tres días después del refuerzo de pre-fusión, y el bazo se cosechó. Las células B fueron perfundidas a partir del bazo, lavadas y se re-suspendidas en un número igual de

células de mieloma SP2/0 (depósito ATTC CRL-1581). Las células totales se sedimentaron, y la fusión se realizó con 1 ml de PEG y se cultivaron a 37°C H-SFM GIBCO® con suplemento de HAT (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) con FBS al 10% (Hyclone, Logan, UT). Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C. Los híbridos se sometieron a ensayo 10-14 días más tarde para determinar la reactividad anti-Pep2 de *T. cruzi* en un EIA de microtitulación. Los resultados indicaron que el híbrido 9-638 secretaba anticuerpo específico anti-Pep2.

Clonación y subclonación de hibridoma

Se seleccionó el hibridoma 9-638 para la clonación de dilución limitante. Las células se suspendieron y luego se diluyeron en serie 10^4 , 10^5 y 10^6 en 20 ml de H-SFM con FBS al 10%. Cada dilución se cultivó en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de suspensión de células por pocillo. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-Pep2, y se seleccionó el clon 9-638-132.

Se seleccionó el clon 9-638-132 para la subclonación utilizando FACS. Se coloreó una suspensión celular con Alexa Fluor 488-anti ratón de cabra. Los productos aislados de una sola célula del 1% superior de esta población de células teñidas se depositaron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de H-SFM con FBS al 10%. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-Pep2, y se seleccionó el clon 9-638-132-115.

Se expandió el clon 9-638-132-115 del cultivo de tejidos a una botella de cultivo rotatoria de 850 cm², pase celular 6, en H-SFM con FBS al 10%. La suspensión del pase celular 6 se sedimentó. El sedimento se resuspendió después en un medio de congelación y se dispensó en crioviales. Los viales se almacenaron en el almacenamiento de nitrógeno líquido

Ejemplo 3: Líneas de células productoras de anticuerpos contra el antígeno recombinante FP10 de Chagas (Chagas 10-745-140)

Fuente de inmunógeno

Se obtuvo la línea celular de antígeno FP10 de Chagas (SEQ ID NO: 6.) del laboratorio del Dr. Louis Kirchoff, Universidad de Iowa, para un banco de semillas en el Condado de Lake. La secuencia de ADNc (SEQ ID NO.: 5) que codificaba este antígeno se clonó en los vectores de expresión pET, y se procesaron las células y el antígeno recombinante purificado como se describe en el Ejemplo 1.

Inmunización de animales

Se inmunizaron ratones hembra RBf/dnJ tres veces con antígeno recombinante FP10 de Chagas purificado utilizando el Sistema Coadyuvante de Freund antes de la comprobación de los antisueros para determinar un título suficiente. El inóculo se preparó diluyendo el antígeno en cloruro de sodio al 0,9% y emulsionando con un volumen igual de coadyuvante. En las semanas 0, 3 y 6, se administró un refuerzo 20 µg a los ratones. Se utilizó Coadyuvante Completo de Freund para el refuerzo primario administrado por vía subcutánea, y se utilizó Coadyuvante Incompleto de Freund para los siguientes 2 refuerzos intradérmicos. Dos semanas después del 3^{er} refuerzo, se tomó una muestra de suero para un ensayo de titulación específico anti-*T. cruzi*, y se seleccionó el ratón núm. 230 para el experimento de fusión. Tres días antes de la fusión, se administró al ratón núm. 230 un refuerzo pre-fusión que consistía en 25 µg de antígeno recombinante FP10 y 25 µg de un péptido sintético de 14 aminoácidos que representa el dominio L del antígeno recombinante FP10.

Creación de hibridoma

Los hibridomas se desarrollaron utilizando la técnica de la fusión mediada por PEG descrita por Galfre *et al.* (Galfre *et al.*, 1977). El ratón núm. RBf/dnJ núm. 230 se sacrificó tres días después del refuerzo pre-fusión, y el bazo se cosechó. Las células B se perfundieron a partir del bazo, se lavaron y se re-suspendieron en un número igual de células de mieloma SP2/0 (depósito ATTC CRL-1581). Las células totales se sedimentaron, y la fusión se realizó con 1 ml de PEG y se cultivaron a 37°C en H-SFM GIBCO® con un suplemento de HAT (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) con FBS al 10% (Hyclone, Logan, UT). Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C. Los hibridomas resultantes se sometieron a ensayo 10-14 días más tarde para determinar la reactividad anti-FP10 de *T. cruzi* en un EIA. Se seleccionó un hibridoma que secretaba AcMo anti-FP10 de *T. cruzi* conocido como 10-745.

Clonación de hibridoma

Se seleccionó 10-745 híbrido para una clonación de dilución limitante. Las células se suspendieron y luego se diluyeron en serie a 10^4 , 10^5 y 10^6 en 20 ml de H-SFM con FBS al 10%. Cada dilución se cultivó en placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de suspensión de células por pocillo. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-FP10 que dio como resultado la selección del clon 10-745-140.

Se expandió el clon 10-745-140 del cultivo de tejidos en un matraz T75, paso de células 2, en IMDM con FBS al 10%. La suspensión del pase celular 2 se sedimentó por centrifugación. El sedimento se resuspendió en medio de congelación y se dispensó en crioviales adecuadamente etiquetados. Los viales se almacenaron en los tanques de almacenamiento de nitrógeno líquido.

Ejemplo 4: Líneas celulares que producen anticuerpos contra el antígeno recombinante FRA de Chagas (Chagas FRA 8-367-171)

Fuente de inmunógeno

La línea celular de antígeno de *T. cruzi* que contenía la región FRA (SEQ ID NO.: 8) comprendida en el polipéptido FP6, se obtuvo del laboratorio del Dr. Louis Kirchoff, Universidad de Iowa, para un banco de semillas en el Condado de Lake. La secuencia de ADNc que codificaba este antígeno (SEQ ID NO.: 7) se clonó en los vectores de expresión pET, y las células se procesaron y el antígeno recombinante se purificó como se describe en el Ejemplo 1.

Vacunas animales

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra tres veces con antígeno recombinante FP6 de Chagas purificado utilizando el Sistema Coadyuvante de Freund antes de la comprobación de los antisueros para determinar un título suficiente. El inóculo se preparó diluyendo el antígeno en cloruro de sodio al 0,9% y emulsionando con un volumen igual de coadyuvante. En las semanas 0, 4 y 10, se administró un refuerzo de 10 µg a los ratones. Se utilizó Coadyuvante Completo de Freund para el refuerzo primario administrado por vía subcutánea y se utilizó Coadyuvante Incompleto de Freund para los siguientes 2 refuerzos intradérmicos. Dos semanas después del tercer refuerzo, se tomó una muestra de suero para un ensayo de titulación anti-*T. cruzi* específico, y se seleccionó el ratón núm. 1907 para el experimento de fusión. Tres días antes de la fusión, se administró al ratón núm. 1907 un refuerzo pre-fusión que consistía en 25 µg de antígeno recombinante y 25 µg de un péptido sintético que representaba el dominio FRA del antígeno recombinante.

Creación de hibridoma

Los hibridomas se desarrollaron utilizando la técnica de fusión mediada por PEG descrita por Galfre *et al.* (Galfre *et al.*, 1977). El ratón BALB/c núm. 1907 se sacrificó tres días después del refuerzo pre-fusión, y se cosechó el bazo. Las células B se perfundieron a partir del bazo, se lavaron y se re-suspendieron en un número igual de células de mieloma SP2/0 (depósito ATTC CRL-1581). Las células totales se sedimentaron, y la fusión se realizó con 1 ml de PEG y se cultivaron a 37°C en H-SFM GIBCO® con suplemento de HAT (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) con FBS al 10% (Hyclone, Logan, UT). Las células se cultivaron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C. Los hibridomas resultantes se sometieron a ensayo 10-14 días más tarde para determinar la reactividad anti-dominio FRA de *T. cruzi* en un EIA. Se seleccionó un hibridoma que secretaba AcMo anti-dominio FRA de *T. cruzi* conocido como 8-367.

Clonación de hibridoma

Se seleccionó 8-367 híbrido para una clonación de dilución limitante. Las células se suspendieron y luego se diluyeron en serie a diluciones 10^4 , 10^5 y 10^6 en 20 ml de H-SFM con FBS al 10%. Cada dilución se cultivó en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos con 0,2 ml de suspensión de células por pocillo. Las placas se incubaron durante 10-14 días a 37°C en una incubadora humidificada. Dado que el crecimiento se hizo evidente, los sobrenadantes se sometieron a ensayo en un EIA de microtitulación anti-FRA, y se seleccionó el clon 8-367-171.

Se expandió el clon 8-367-171 del cultivo de tejidos en un matraz T75, pase 3 de células, en IMDM con FBS al 10%. La suspensión de pase 3 de células se sedimentó, se resuspendió en medio de congelación y se dispensó en crioviales. Los viales se almacenaron en los tanques de almacenamiento de nitrógeno líquido.

Ejemplo 5: Líneas celulares productoras de AcMo anti-FP3 de *T. cruzi* quimérico (Chagas FP3 12-392-150CHO2580-104)

En este ejemplo y en los ejemplos posteriores dirigidos a la creación de líneas de células de mamífero que expresaban anticuerpos monoclonales quiméricos ratón-humano, se adoptó el siguiente enfoque general. Después de identificar las líneas celulares de hibridoma que secretaban los AcMo deseados (tales como los hibridomas de los

Ejemplos 1-4), se aisló el ARNm de estas células y se identificaron las secuencias de los genes de los anticuerpos. Se clonaron las secuencias V_L y V_H en vectores de pBOS, que suministraban las secuencias constantes del anticuerpo humano (Mizushima S, Nagata S., "pEF-BOS, , a powerful mammalian expression vector." Nucleic Acids Res. 1990 11 de septiembre; 18(17): 5322 y documento US 2005/0227289 (Incorporados como referencia por sus enseñanzas respecto al uso de estos vectores y los propios vectores)), que fueron entonces co-transfectados en un sistema de expresión transitoria para confirmar que los anticuerpos quiméricos resultantes eran funcionales. Tras la confirmación, se subclonaron las secuencias de V_L en pJV, y las secuencias de V_H en pBV; estos vectores, se utilizaron a continuación para construir un vector de expresión pBJ estable. El plásmido pJV se obtuvo de Abbott Laboratories (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) y comprende un promotor de SV40, un gen DHFR murino, un intensificador, un promotor, y un región central no esencial de lambda. El plásmido pBV (también obtenido de Abbott Laboratories, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) comprende un intensificador, un promotor, y una una región central no esencial de lambda. Se transfectaron células de Ovario de Hámster Chino (CHO) con pBJ, se seleccionaron los transfectantes estables, y los anticuerpos secretados se sometieron a ensayo de nuevo. La **FIG. 1** muestra un resumen esquemático de los anticuerpos quiméricos, en los que los genes de la región variable murina (porción de unión a antígeno) se transfieren a vectores en los que adjuntan genes de región constante humana.

Identificación de las secuencias V_H y V_L de ratón

Se cultivó línea celular de hibridoma HBFP3 (Ejemplo 1) en H-SFM para obtener $\sim 5 \times 10^6$ células para la purificación de ARNm de acuerdo con los protocolos de extracción de mRNA convencionales. El ARNm purificado se utilizó como molde con un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen (EMD Biosciences, Inc.); Madison, WI) en una reacción de RT-PCR. Se observaron productos de PCR positivos a partir de los cebadores B y C de la cadena pesada (H) (clones HB y HC) y a partir de los cebadores A, B, C, y G de la cadena ligera (L) (clones LA, LB, LC, y LG). Todos los productos de PCR positivos se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR TOPO TA 2.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADN del plásmido se purificó a partir de las células bacterianas transformadas y los insertos V_H o V_L se confirmaron por digestión con *EcoRI* para cada reacción de RT-PCR que generó productos de tamaño apropiado. La secuencia génica de V_H o V_L se seleccionó después de que los alineamientos de secuencias confirmaran una secuencia consenso entre los clones. El clon HB1 de TOPO-TA de Chagas contenía la correcta génica de V_H correcta, y el clon LG3 de de TOPO-TA de Chagas contenía la secuencia génica de V_L correcta.

Clonación de los genes de V_H y V_L murinos en vectores pBOS

Un par de cebadores de PCR que contenía una secuencia señal Kappa parcial con un sitio *NruI* en el cebador 5', y un sitio *BsiWI* en el cebador 3' se utilizó para amplificar el gen V_L de ratón del clon LG3 de TOPO. Además, se utilizó un par de cebadores que contenía una secuencia señal de la cadena pesada parcial y un sitio *NruI* en el cebador 5', y un sitio *SalI* en el cebador 3' para amplificar el gen V_H de ratón a partir del clon HB 1 de TOPO. El producto de la PCR de V_L se digirió con las enzimas de restricción *NruI* y *BsiWI* y se ligó en el vector pBOS-HCK digerido con las mismas enzimas. El producto de la PCR de V_H se digirió con las enzimas de restricción *NruI* y *SalI* y se ligó en el vector pBOS-hCgl digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos de numerosas colonias bacterianas transformadas se secuenciaron para confirmar la presencia de cualquiera de los genes de V_H o V_L de Chagas en sus respectivos vectores. Se consideraron correctos Chagas el clon 4 de 12-392-150 V_H _pBOS-H y el clon 5 de Chagas 12-392-150 V_L _pBOS-L.

Producción de AcMo quimérico y confirmación funcional

Se utilizaron preparaciones de plásmidos libres de endotoxina del clon 1 de Chagas 12-392-150 V_H _pBOS-H y el clon 4 de Chagas 12-392-150 V_L _pBOS-L para la transfección transitoria en células COS 7L por medio de electroporación (PULSER® GENE, Bio-Rad; Hercules, CA). Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante tres días. El anticuerpo quimérico producido por las células COS 7L se cosechó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y después se purificó utilizando una columna de afinidad de proteína A (POROS A; Applied Biosystems; Foster City, CA). Para confirmar la actividad, se analizó el anticuerpo cosechado utilizando la resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore® (Biacore (GE Healthcare); Piscataway, NJ).

Clonación del vector de expresión estable de la línea celular CHO

Se utilizaron el clon 1 de Chagas 12-392-150 V_H _pBOS-H y el clon 4 de Chagas 12-392-150 V_L _pBOS-L para construir un plásmido para generar una línea celular CHO transfectada estable. En primer lugar, se utilizaron *SrfI* y *NotI* para aislar los genes V_H -CH y V_L -CL de los vectores pBOS; estos fragmentos se clonaron en los vectores pBV o pJV, respectivamente. Ambos vectores fueron adquiridos de Abbott Bioresearch Center (Worcester, MA) y contenían secuencias reguladoras necesarias para la expresión de los genes de anticuerpos. Los clones pBV y pJV resultantes se analizaron por medio de digestión con enzimas de restricción *SrfI* / *NotI* y se secuenciaron para determinar que el clon 4 de Chagas 10-745 V_H _PBV y el clon 1 de Chagas 12-392-150_pJV eran correctos. En

segundo lugar, los clones correctos pBV o pJV fueron digeridos ambos con *Pac* I y *Asc* I, y los fragmentos de ADN de contenían V_H-CH y V_L-CL se ligaron para formar un único plásmido pBJ que contenía ambos genes de las cadenas pesadas y ligeras. Los clones pBJ se escrutaron mediante digestión con *Srf* I /*Not* I para confirmar la presencia de ambos genes de anticuerpos. El mapa del plásmido para el clon 4 de Chagas 12-392-150 Mu-Hu_pBJ se muestra en la **FIG. 2**; las secuencias de polinucleótidos doble cadena de los genes V_H y V_L gen que contenían las regiones (y las secuencias limítrofes) se muestran en las **Figs. 3A-C**.

Se utilizó la línea celular CHO B3.2 adquirida del Abbott Bioresearch Center que contenía un gen de dihidrofolato reductasa defectuoso (*DHFR*) para la transfección y la expresión del anticuerpo estable. Las células CHO B3.2 se transfectaron con el clon 1 de Chagas 12-392-150 Mu-Hu_pBJ usando la transfección mediada por fosfato de calcio. Las células CHO transfectadas se cultivaron durante varias semanas con medios que carecían de timidina para seleccionar aquellas células que habían incorporado el gen *DHFR* funcional presente en el plásmido pBJ. Se utilizó la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para clasificar las células individuales de la reserva transfectada en placas de 96 pocillos. Se utilizó un EIA específico del antígeno para clasificar la producción de anticuerpos entre los clones, y los productores más altos se expandieron y se volvieron a analizar. Los clones se deshabituaron a continuación en medio libre de suero. Se controlaron las características de crecimiento, la producción de anticuerpos y clonalidad de los clones. Se subclonó el clon FP3 de Chagas 12-392-150 CHO 2580-104 para clasificar las células individuales en placas de 96 pocillos y luego se expandieron para producir anticuerpo purificado.

Ejemplo 6: Líneas celulares productoras de AcMo anti-epítipo Pep2 de *T. cruzi* quiméricos (anti-TcF y anti-FP6) (clon 9-638-1928 de Pep2 de Chagas)

Identificación de secuencias V_H y V_L de ratón

Se cultivó la línea celular de hibridoma HBPe2 (Ejemplo 2) H-SFM para obtener ~ 5 x 10⁶ células para la purificación del ARNm de acuerdo con los protocolos de extracción de ARNm convencionales. El ARNm purificado se utilizó como molde con un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen (EMD Biosciences, Inc.)) para una reacción de RT-PCR. Se observaron productos de PCR positivos de los cebadores B y E de la cadena pesada (H) (clones HB y HE) y de los cebadores B, C, D, E, F y G de la cadena ligera (L) (clones LB, LC, LD, LE, LF y LG). Todos los productos de PCR positivos se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR TOPO TA 2.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADN del plásmido se purificó a partir de células bacterianas transformadas y los insertos V_H o V_L se confirmaron por medio de digestión con *Eco*RI para cada reacción de RT-PCR que generó productos de tamaño apropiado. La secuencia génica de V_H o V_L correcta se seleccionó después de que los alineamientos de secuencia confirmaran una secuencia de consenso entre los clones. El clon HE2 de TOPO-TA de Chagas contenía la secuencia génica de V_H correcta, y el clon LG1 de TOPO-TA de Chagas contenía la secuencia génica de V_L correcta.

Clonación de genes V_H y V_L murinos en vectores pBOS

Se utilizó un par de cebadores de PCR que contenían una secuencia señal Kappa parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Bsi*W I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_L de ratón a partir del clon LG1 de TOPO. Además, se utilizó un par de cebadores que contenían una secuencia señal de la cadena pesada parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Sal* I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_H de ratón a partir del clon HE2 de TOPO. El producto de la PCR de V_L se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Bsi*W I y se ligó en el vector pBOS-HCK digerido con las mismas enzimas. El producto la OCR de V_H se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Sal* I y se ligó en el vector pBOS-hCgl digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos procedentes de numerosas colonias bacterianas transformadas se secuenciaron para confirmar la presencia de cualquiera de los genes de V_H o V_L de Chagas en sus respectivos vectores. Se consideró que el clon A2 de Chagas 9-638 V_H_pBOS-H y el clon B6 de Chagas 9-638 V_L_pBOS-L eran correctos.

Producción de AcMo quimérico y confirmación funcional

Se utilizaron preparaciones de plásmidos libres de endotoxina del clon A2 de Chagas 9-638 V_H_pBOS-H y el con B6 de Chagas 9-638 V_L_pBOS-L para la transfección transitoria en células COS 7L por electroporación (GENE PULSER®, Bio-Rad, Hercules, CA). Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante tres días. El anticuerpo quimérico producido por las células COS 7L se cosechó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y después se purificó utilizando una columna de afinidad de proteína A (POROS A; Applied Biosystems). Para confirmar la actividad, se analizó el anticuerpo cosechado utilizando la resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore® (Biacore (GE Healthcare); Piscataway, NJ). La afinidad fue de aproximadamente 2,6 nM.

Clonación del vector de expresión estable de la línea celular CHO

Se utilizaron el clon A2 de Chagas 9-638 V_H_pBOS-H y el clon B6 de Chagas 9-638 V_L_pBOS-L para construir un plásmido para generar una línea celular CHO transfectada estable. En primer lugar, se utilizaron *Srf* I y *Not* I para aislar los genes de V_H-CH y V_L-CL de los vectores pBOS; estos fragmentos se clonaron en los vectores pBV o pJV, respectivamente. Los clones de pBV y pJV clones resultantes se analizaron por medio de digestión con las enzimas de restricción *Srf* I / *Not* I y se secuenciaron para determinar que el clon 10 de Chagas 9-638 V_H_pBV y el clon 10 de Chagas 9-638_pJV eran correctos. En segundo lugar, los clones pBV o pJV correctos fueron digeridos ambos con *Pac* I y *Asc* I, y los fragmentos de ADN que contenían V_H-CH y V_L-CL se ligaron para formar un único plásmido pBJ que contiene ambos genes de las cadenas pesadas y ligeras. Los clones pBJ se seleccionaron por medio de digestión con *Srf* I / *Not* I para confirmar la presencia de ambos genes de anticuerpos. El mapa del plásmido para el clon 2 de Chagas 9-638 Mu-Hu_pBJ se muestra en la FIG. 4.

Se utilizó la línea de células CHO B3.2 adquirida del Abbott Bioresearch Center que contiene un gen *DHFR* defectuoso para la transfección y expresión estable del anticuerpo. Las células CHO B3.2 se transfectaron con el clon 2 de Chagas 9-638 Mu-Hu_pBJ utilizando la transfección mediada por fosfato de calcio. Las células CHO transfectadas se cultivaron durante varias semanas con medios que carecen de timidina para seleccionar aquellas células que habían incorporado el gen *DHFR* funcional presente en el plásmido pBJ. Se utilizó FACS para ordenar las células individuales de la reserva transfectada en placas de 96 pocillos. Se utilizó un EIA específico del antígeno para clasificar la producción de anticuerpos entre los clones, y los mayores productores se expandieron y se volvieron a analizar. Los clones fueron deshabitados a continuación en medio libre de suero. Se controlaron las características de crecimiento, producción de anticuerpos y clonalidad de los clones. Se seleccionó el clon 9-638-1145 de Chagas Pep2 y se volvió a subclonar mediante clasificación de células individuales en placas de 96 pocillos, y después se expandió el clon 9-638-1928 de Chagas Pep2 para producir anticuerpo purificado.

Ejemplo 7: Líneas celulares productoras de AcMo anti-FP10 de *T. cruzi* quimérico (Chagas FP10 10-745-3796)

Identificación de secuencias de V_H y V_L de ratón

Se cultivó la línea celular de hibridoma HBFP10 (Ejemplo 3) en H-SFM para obtener ~ 5 x 10⁶ células para la purificación de ARNm de acuerdo con protocolos de extracción de ARNm convencionales. El ARNm purificado se utilizó como molde con un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen (EMD Biosciences, Inc.)) para una reacción de RT-PCR. Se observaron productos de PCR positivos a partir de los cebadores B de la cadena pesada (H) (clones HB) y de los cebadores B, C y G la cadena ligera (L) (clones LB, LC y LG). Todos los productos de PCR positivos se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR TOPO TA 2.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADN del plásmido se purificó a partir de células bacterianas transformadas y se confirmaron los insertos de V_H o V_L por medio de digestión con *Eco*RI para cada reacción de RT-PCR que generó productos de tamaño apropiado. La secuencia génica de V_H o V_L correcta se seleccionó después de que los alineamientos de secuencia confirmaran una secuencia de consenso entre los clones. El clon HB3 de TOPO-TA de Chagas contenía la secuencia génica de V_H correcta, y el clon LG1 de TOPO-TA de Chagas contenía la secuencia génica de V_L correcta.

Clonación de los genes de V_H y V_L murinos en vectores pBOS

Se utilizó un par de cebadores de PCR que contenían una secuencia señal de Kappa parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Bsi*W I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_L de ratón a partir del clon LG1 de TOPO. Adicionalmente, se utilizó un par de cebadores que contenían una secuencia señal de la cadena pesada parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Sal* I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_H de ratón a partir del clon HB3 de TOPO. El producto de la PCR de V_L se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Bsi*W I y se ligó en el vector pBOS-hCk digerido con las mismas enzimas. El producto de la PCR de V_H se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Sal* I y se ligó en el vector pBOS-hCgl digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos procedentes de numerosas colonias bacterianas transformadas se secuenciaron para confirmar la presencia de cualquiera de los genes de V_H o V_L de Chagas en sus respectivos vectores. El clon 4 de Chagas 10-745 V_H_pBOS-H y el clon 5 de Chagas 10-745 V_L_pBOS-L se consideraron correctos.

Producción de AcMo quimérico y confirmación funcional

Se utilizaron preparaciones de plásmidos libres de endotoxinas del clon 4 de Chagas 10-745 V_H_pBOS-H y del clon 5 de Chagas 10-745 V_L_pBOS-L para la transfección transitoria en células COS 7L por medio de electroporación (GENE PULSER®, Bio-Rad). Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante tres días. El anticuerpo quimérico producido por las células COS 7L se cosechó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y después se purificó utilizando una columna de afinidad de proteína A (POROS A; Applied Biosystems). Para confirmar la actividad, se analizó el anticuerpo cosechado mediante resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore® (Biacore (GE Healthcare)).

Clonación de vector de expresión estable de la línea de células CHO

Se utilizaron el clon 4 de Chagas 10-745 V_H_pBOS-H y el clon 5 de Chagas 10-745 V_L_pBOS-L clon 5 se para construir un plásmido para generar una línea de células CHO transfectada estable. En primer lugar, se utilizaron *Srf* I y *Not* I para aislar los genes de V_H-CH y V_L-CL de los vectores pBOS; estos fragmentos se clonaron a continuación en los vectores pBV o pJV, respectivamente. Los clones de pBV y pJV resultantes se analizaron por medio de digestión con las enzimas de restricción *Srf* I / *Not* I y se secuenciaron para determinar que el clon 1 de Chagas 10-745 V_H_pBV y el clon 1 de Chagas 10-745_pJV eran correctos. En segundo lugar, los clones correctos pBV o pJV fueron digeridos ambos con *Pac* I y *Asc* I, y los fragmentos de ADN resultantes que contenían V_H-CH y V_L-CL se ligaron para formar un único plásmido pBJ que contenía ambos genes de las cadenas pesadas y ligeras. Los clones de pBJ se escrutaron por medio de digestión con *Srf* I / *Not* I para confirmar la presencia de ambos genes de anticuerpos. El mapa del plásmido para el clon 1 de Chagas 10-745 Mu-Hu_pBJ se muestra en la FIG. 5.

Se utilizó la línea de células CHO B3.2 adquirida del Abbott Bioresearch Center que contiene un gen *DHFR* defectuoso para la transfección y expresión del anticuerpo estable. Las células CHO B3.2 fueron transfectadas con el clon 1 de Chagas 10-745 Mu-Hu_pBJ usando la transfección mediada por fosfato de calcio. Las células CHO transfectadas fueron cultivadas durante varias semanas con medios que carecían de timidina para seleccionar aquellas células que habían incorporado el gen *DHFR* funcional presente en el plásmido pBJ. Se utilizó FACS para clasificar las células individuales de la reserva transfectada en placas de 96 pocillos. Se utilizó un EIA específico del antígeno para clasificar la producción de anticuerpos entre los clones, y se expandieron los mayores productores y se volvieron a analizar. A continuación los clones se deshabituaron en medio libre de suero. Se verificaron las características de crecimiento, producción de anticuerpos y clonalidad de los clones. El clon 10-745-3649 de Chagas FP10 se sub-clonó mediante clasificación de las células individuales en placas de 96 pocillos y luego se expandió para producir anticuerpo purificado.

Ejemplo 8: Líneas celulares que producen AcMo anti-FRA de *T. cruzi* quiméricos (Ejemplo profético)

Identificación de las secuencias de V_H y V_L de ratón

Se cultivó la línea celular de hibridoma HBFRA (Ejemplo 4) en H-SFM para obtener ~ 5 x 10⁶ células para la purificación de ARNm de acuerdo con protocolos de extracción de ARNm convencionales. El ARNm purificado se utilizó como molde con un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen (EMD Biosciences, Inc.)) para una reacción de RT-PCR. Se observaron productos de PCR positivos de los cebadores de la cadena pesada (H) y de los cebadores de la cadena ligera (L). Todos los productos de PCR positivos se purificaron en gel y se clonaron en un vector pCR TOPO TA 2.1 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADN del plásmido se purificó a partir de las células bacterianas transformadas y los insertos de V_H o V_L se confirmaron mediante digestión con *Eco*RI para cada reacción de RT-PCR que generó productos de tamaño apropiado. La secuencia del gen de V_H o V_L correcta se seleccionó después de que los alineamientos de secuencia confirmaran una secuencia de consenso entre los clones.

Clonación de los genes de V_H y V_L murinos en vectores de pBOS

Se utilizó un par de cebadores de PCR que contenían una secuencia señal de Kappa parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Bsi*W I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_L de ratón a partir de TOPO. Adicionalmente, se utilizó un par de cebadores que contenían una secuencia señal de la cadena pesada parcial y un sitio *Nru* I en el cebador 5', y un sitio *Sal* I en el cebador 3' para amplificar el gen de V_H de ratón a partir del clon TOPO. El producto de la PCR de V_L se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Bsi*W I y se ligó en el vector pBOS-hCk digerido con las mismas enzimas. El producto de la PCR de V_H se digirió con las enzimas de restricción *Nru* I y *Sal* I y se ligó en el vector pBOS-hCgl digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos procedentes numerosas colonias bacterianas transformadas se secuenciaron para confirmar la presencia de cualquiera de los genes de V_H o V_L de Chagas en sus respectivos vectores (Chagas V_H_pBOS-H y Chagas V_L_pBOS-L).

Producción de AcMo quimérico y confirmación funcional

Se utilizaron preparaciones de plásmidos libres de endotoxinas de Chagas V_H_pBOS-H y Chagas V_L_pBOS-L para la transfección transitoria en células COS 7L por electroporación (Gene PULSER®, Bio-Rad) u otro método de transfección. Las células transfectadas se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% durante aproximadamente tres días. El anticuerpo quimérico producido por las células COS 7L se recogió por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y después se purificó utilizando una columna de afinidad de proteína A (POROS A; Applied Biosystems; Foster City, CA). Para confirmar la actividad, el anticuerpo cosechado se analizó, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial en un aparato Biacore® (Biacore (GE Healthcare)).

Clonación del vector de expresión estable de la línea de células CHO

Se utilizaron Chagas V_H_pBOS-H y Chagas V_L_pBOS-L para construir un plásmido para generar una línea de células CHO transfectada estable. En primer lugar, se utilizaron *Srf* I y *Not* I para aislar los genes de V_H-CH y V_L-CL

de los vectores pBOS; estos fragmentos se clonaron a continuación en los vectores pBV o pJV, respectivamente. Los clones pBV y pJV resultantes se analizaron por medio de digestión con las enzimas de restricción *Srf I* / *Not I* y se secuenciaron para determinar que los clones eran correctos. En segundo lugar, los clones pBV o pJV correctos fueron ambos digeridos con *Pac I* y *Asc I*, y los fragmentos de ADN que contenían V_H-CH y V_L-CL resultantes se

ligaron para formar un único plásmido pBJ que contenía ambos genes de las cadenas pesadas y ligeras. Los clones pBJ se escrutaron mediante digestión con *Srf Y* / *Not I* para confirmar la presencia de ambos genes de anticuerpos, dando como resultado Chagas Mu-Hu_pBJ.

Se utilizó una línea de células CHO, tal como CHO B3.2, que contenía un gen *DHFR* defectuoso para la transfección y la expresión del anticuerpo estable. Las células CHO B3.2 fueron transfectadas con Chagas Mu-Hu_pBJ usando la transfección mediada por fosfato de calcio u otro protocolo de transfección. Las células CHO transfectadas se cultivaron durante varias semanas con medios que carecían de timidina para seleccionar aquellas células que incorporaban el gen *DHFR* funcional presente en el plásmido pBJ. Se puede utilizar FACS para clasificar las células individuales de la reserva transfectada en placas de 96 pocillos. Se pudo utilizar un EIA específico del antígeno para clasificar la producción de anticuerpos entre los clones, y los mayores productores se expandieron y se volvieron a analizar. Los clones se deshabituaron a continuación en medio libre de suero. Se verificaron las características de crecimiento, producción de anticuerpos y clonalidad de los clones. Cuando se deseó, los clones de las líneas celulares pudieron ser sub-clonados mediante clasificación de las células individuales en placas de 96 pocillos y luego expandidos para producir anticuerpo purificado.

Ejemplo 9: Determinación de la Cinética/Afinidad del anticuerpo quimérico recombinante para el antígeno TcF de Chagas

Se determinaron la cinética/afinidad utilizando un biosensor de captura de cabra anti-Fc de IgG humana de alta densidad en BIAcore 2000. Las células de flujo se equilibraron primero con un tampón de migración compuesto de HBS-EP enriquecida con 6 g/L de carboximetil-dextrano (en lo sucesivo denominado "Tampón de migración") (Fluka) y 6 g/L de BSA durante 5 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto. A continuación, el anticuerpo monoclonal anti-Chagas quimérico recombinante, a saber, 9-638-132 (epítipo Pep2 en TcF y FP6), 10-745-140 (FP10) y 12-392-150 (FP3), cada uno diluido en Tampón de migración, se inyectó sobre células de flujo individuales y fue capturado por el biosensor con una célula de flujo dejada en blanco como celda de flujo de referencia. La velocidad de flujo de tampón se incrementó a 100 µl/minuto y las células de flujo se lavaron durante 10 minutos antes de una inyección de 150 µL del antígeno a diversas concentraciones de 0 a 100 nM en Tampón de migración seguido de Tampón de migración solo durante 60 a 360 segundos. A continuación, el biosensor de captura de anti-IgG humana se regeneró con tres inyecciones de 33 µL de H₃PO₄ 100 mM y se repitieron los pasos anteriores hasta que todas las concentraciones de cada antígeno de Chagas se sometieron a ensayo por duplicado. Se verificaron la cinética de unión, la asociación (k_a) y la disociación (k_d), para cada inyección de antígeno por medio de sensogramas y se determinó la cinética/afinidad por medio del soporte lógico Scrubber 2.0 (BioLogic Software Pty Ltd, Australia). Las interacciones entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas recombinantes quiméricos y el epítipo Pep2 dentro del antígeno TcF de Chagas se muestran a continuación en la Tabla 14.

Tabla 14

Ac Chagas Quimérico	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)
9-638-132	$4,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-9}$
10-745-140	No se observó unión.		
12-392-150			

Ejemplo 10: Determinación de la cinética/afinidad del anticuerpo contra Chagas quimérico recombinante para los antígenos FP3 y FP10 de Chagas

Se determinó la cinética/afinidad utilizando un biosensor de captura anti-His₄ de alta densidad en un BIAcore 2000. Las células de flujo se equilibraron primero con un Tampón de migración (como se ha definido anteriormente en el Ejemplo 9), compuesto de tampón HBS-EP enriquecido con BSA al 1% y Tween 20 al 1% durante 5 minutos a una velocidad de flujo de 50 µL/minuto. A continuación, los antígenos de Chagas (cada antígeno contiene una etiqueta His₆), a saber, FP10 y FP3, se diluyeron cada uno en Tampón de migración, se inyectaron sobre células de flujo individuales y fueron capturados por el biosensor con una célula de flujo dejada en blanco como celda de flujo de referencia. La velocidad de flujo de tampón se incrementó a 100 µL/minuto y las células de flujo se lavaron durante 5 minutos antes de una inyección de 150 µL de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-Chagas recombinantes quiméricos, a saber, 9-638-132 (epítipo Pep2 en TcF y FP6), 10-745-140 (FP310), y 12-392-150 (FP3), a varias concentraciones entre 0 y 300 nM en Tampón de migración seguido de Tampón de migración solo durante 60 a 360 segundos. El biosensor de captura anti-His₄ se regeneró a continuación con dos inyecciones de 35 µL de Tampón de elución Gentle Ab/Ag (Pierce) enriquecido con H₃PO₄ 2,5 mM y dos inyecciones de 25 µL de H₃PO₄ 5 mM y se repitieron las etapas anteriores hasta que todas las concentraciones de cada anticuerpo anti-Chagas quimérico se

sometieron a ensayo por duplicado. Se verificaron la cinética de unión, la asociación (k_a) y la disociación (k_d) para cada inyección de anticuerpo por medio de sensogramas y se determinó la cinética/afinidad por medio de un soporte lógico Scrubber 2.0 (BioLogic Software Pty Ltd, Australia). Las interacciones entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas recombinantes quiméricos con el antígeno FP10 de Chagas se muestran a continuación en la Tabla 15.

5 Las interacciones entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas recombinantes quiméricos y el antígeno FP3 de Chagas se muestran a continuación en la Tabla 16.

Tabla 15

Ac Chagas Quimérico	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
9-638-132	No se observó unión.		
10-745-140	$1,2 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-9}$
12-392-150	No se observó unión.		

10

Tabla 16

Ac Chagas Quimérico	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
9-638-132	No se observó unión.		
10-745-140			
12-392-150	$2,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-10}$

Ejemplo 11: Determinación de la Cinética/afinidad de anticuerpo contra Chagas murino para antígenos de Chagas

Se determinó la cinética/afinidad utilizando un biosensor de captura de conejo anti-IgG de ratón de alta densidad, en un BIAcore 2000. Las células de flujo se equilibraron primero con un Tampón de migración compuesto de tampón HBS-EP enriquecido con BSA al 1%, carboximetil-dextrano al 1% ("Tampón de migración") (Fluka), y Tween 20 al 0,1% a 5 μ L/minuto durante 5 minutos. A continuación, cada anticuerpo anti-Chagas murino (es decir, los anticuerpos monoclonales (AcMo) 8-367-171 (FRA), 9-638-132 (epítipo Pep2 en TcF y FP6), 10-745-140 (FP10) y 12-392-150 (FP3) diluido en Tampón de migración, se inyectó en células de flujo individuales y fue capturado por el biosensor. La velocidad de flujo de tampón se incrementó a 60 μ L/min y las células de flujo se lavaron durante 5 minutos antes de una inyección de 150 μ L de antígeno de Chagas a diversas concentraciones de 0 a 200 nM en Tampón de migración seguido de Tampón de migración solo durante 60 a 360 segundos. A continuación, la velocidad de flujo se cambió a 10 μ L/minuto y luego el biosensor de captura anti-IgG de ratón se regeneró con una inyección de 30 μ L de Glicina 10 mM pH 1,7 y se repitieron las etapas anteriores hasta que todas las concentraciones de cada antígeno de Chagas fueron sometidas a ensayo por duplicado. Se verificaron la cinética de unión, la asociación (k_a) y la disociación (k_d) para cada inyección de antígeno por medio de sensogramas y se determinó la cinética/afinidad por medio del soporte lógico Scrubber 2.0 (BioLogic Software Pty Ltd, Australia).

Para los antígenos de Chagas FRA, FP6, TcF, y FP3, se utilizó la celda de flujo que contenía AcMo anti-Chagas 10-745-140 como celda de flujo de referencia. La celda de flujo que contenía AcMo anti-Chagas 9-638-132 se utilizó como celda de flujo de referencia para el antígeno FP10 de Chagas. La interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas con el propio antígeno FRA de Chagas se muestra a continuación en la Tabla 17. La interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas FRA y el epítipo PEP2 de Chagas del antígeno FP6 de Chagas se muestra a continuación en la Tabla 18. La interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas con el epítipo de PEP2 de Chagas del antígeno TcF de Chagas se muestra a continuación en la Tabla 19. La interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas con el antígeno FP10 de Chagas se muestra a continuación en la Tabla 20. La interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-Chagas con el antígeno FP3 de Chagas se muestra a continuación en la Tabla 21.

40

Tabla 17

Ac Chagas Murino	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
8-367-171	$3,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{-1}$	$3,7 \times 10^{-8}$
9-638-132	No se observó unión		
10-745-140			
12-392-150			

Tabla 18

Ac Chagas Murino	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
8-367-171	$1,5 \times 10^6$	$7,9 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-9}$
9-638-132	Se observó unión, pero no se pudo ajustar al modelo 1:1		
10-745-140	No se observó unión		
12-392-150			

Tabla 19

Ac Chagas Murino	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
8-367-171	No se observó unión		
9-638-132	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-2}$	$5,7 \times 10^{-9}$
10-745-140	No se observó unión		
12-392-150			

Tabla 20

Ac Chagas Murino	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
8-367-171	No se observó unión		
9-638-132			
10-745-140	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-9}$
12-392-150	No se observó unión		

5

Tabla 21

Ac de Chagas Murino	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
8-367-171	No se observó unión		
9-638-132			
10-745-140			
12-392-150	$5,6 \times 10^5$	5×10^{-5}	8×10^{-11}

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LABORATORIOS ABBOTT
 Brophy, SUSAN E.
 5 Hawksworth, DAVID
 SHAH, DINESH O.
 Siegel, ROBERT W.
 Tieman, BRYAN c.
 TU, Bailin
 10 TYNER, JOAN D.
 ZIEMANN, ROBERT N.
 <120> ANTICUERPOS ANTI-T. CRUZI Y MÉTODOS DE USO
 <130> 8506WOO1
 <140>
 15 <141>
 <150> 61/017,071
 <151> 2007-12-27
 <150>
 <151> 2008-12-23
 20 <160> 28
 <170> PatentIn Ver.3.3
 <210> 1
 <211> 1518
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 1

atggcccagc	tccaacaggc	agaaaataat	atcactaatt	ccaaaaaaga	aatgacaaaag	60
ctacgagaaa	aagtgaaaaa	ggccgagaaa	gaaaaattgg	acgccattaa	ccgggcaacc	120
aagctggaag	aggaacgaaa	ccaagcgta	aaagcagcac	acaaggcaga	ggaggaaaaag	180
gctaaacat	ttcaacgcct	tataacattt	gagtcggaaa	atattaactt	aaagaaaagg	240
ccaaatgacg	cagtttcaaa	tcgggataag	aaaaaaaatt	ctgaaaccgc	aaaaactgac	300
gaagtagaga	aacagagggc	ggctgaggct	gccaaaggccg	tggagacgga	gaagcagagg	360
gcagctgagg	ccacgaaggt	tgccgaagcg	gagaagcgga	aggcagctga	ggccgccaag	420
gccgtggaga	cggagaagca	gagggcagct	gaagccacga	aggttgccga	agcggagaag	480
cagaaggcag	ctgaggccgc	caaggccgtg	gagacggaga	agcagagggc	agctgaagcc	540
acgaaggttg	ccgaagcgga	gaagcagagg	gcagctgaag	ccatgaaggt	tgccgaagcg	600
gagaagcaga	aggcagctga	ggccgccaag	gccgtggaga	cggagaagca	gagggcagct	660
gaagccacga	aggttgccga	agcggagaag	cagaagcgag	ctgaggccgc	caaggccgtg	720
gagacggaga	agcagagggc	agctgaagcc	acgaaggttg	ccgaagcgga	gaagcagaag	780
gcagctgagg	ccgccaaggg	cgtggagacg	gagaagcaga	gggcagctga	agccacgaag	840
gttgccgaag	cggagaagga	tatcgatccc	atgggtgctt	gtgggtcgaa	ggactcgacg	900
agcgacaagg	ggttggcgag	cgataaggac	ggcaagaacg	ccaaggaccg	caagggaagcg	960
tgggagcgca	ttcgccaggc	gattcctcgt	gagaagaccg	ccgaggcaaa	acagcgccgc	1020
atcgagctct	tcaagaagtt	cgacaagaac	gagaccggga	agctgtgcta	cgatgaggtg	1080
cacagcggct	gcctcgaggt	gctgaagttg	gacgagttca	cgccgcgagt	gcgcgacatc	1140
acgaagcgtg	cattcgacaa	ggcgaaggcc	ctgggcagca	agctggagaa	caaggggtcc	1200
gaggactttg	ttgaattttc	ggagttccgt	ctgatgctgt	gctacatcta	cgactttctc	1260
gagctgacgg	tgatgttcga	cgagattgac	gcctccggca	acatgctggt	tgacgaggag	1320
gagttcaagc	gcgccgtgcc	caggcttgag	gcgtggggcg	ccaaggtcga	ggatcccgcg	1380
gcgctgttca	aggagctcga	taagaacggc	actgggtccg	tgacgttcga	cgagtttgct	1440
gcgtgggctt	ctgcagtcaa	actggacgcc	gacggcgacc	cggacaacgt	gccggagagc	1500
ccgagaccga	tgggaatc					1518

<210> 2
 <211> 506
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 2

Met	Ala	Gln	Leu	Gln	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	1	5	10	15
Glu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Lys	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	20	25	30	
Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	Thr	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Gln	35	40	45	
Ala	Tyr	Lys	Ala	Ala	His	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Phe	50	55	60	
Gln	Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Glu	Asn	Ile	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	65	70	75	80
Pro	Asn	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Arg	Asp	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Glu	Thr	85	90	95	
Ala	Lys	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	100	105	110	
Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	115	120	125	
Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	130	135	140	
Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	145	150	155	160
Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	165	170	175	
Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	180	185	190	
Glu	Ala	Met	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	195	200	205	
Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	210	215	220	
Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	225	230	235	240
Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	245	250	255	

Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys
260 265 270

Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Asp Ile
275 280 285

Asp Pro Met Gly Ala Cys Gly Ser Lys Asp Ser Thr Ser Asp Lys Gly
290 295 300

Leu Ala Ser Asp Lys Asp Gly Lys Asn Ala Lys Asp Arg Lys Glu Ala
305 310 315 320

Trp Glu Arg Ile Arg Gln Ala Ile Pro Arg Glu Lys Thr Ala Glu Ala
325 330 335

Lys Gln Arg Arg Ile Glu Leu Phe Lys Lys Phe Asp Lys Asn Glu Thr
340 345 350

Gly Lys Leu Cys Tyr Asp Glu Val His Ser Gly Cys Leu Glu Val Leu
355 360 365

Lys Leu Asp Glu Phe Thr Pro Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys Arg Ala
370 375 380

Phe Asp Lys Ala Arg Ala Leu Gly Ser Lys Leu Glu Asn Lys Gly Ser
385 390 395 400

Glu Asp Phe Val Glu Phe Leu Glu Phe Arg Leu Met Leu Cys Tyr Ile
405 410 415

Tyr Asp Phe Phe Glu Leu Thr Val Met Phe Asp Glu Ile Asp Ala Ser
420 425 430

Gly Asn Met Leu Val Asp Glu Glu Glu Phe Lys Arg Ala Val Pro Arg
435 440 445

Leu Glu Ala Trp Gly Ala Lys Val Glu Asp Pro Ala Ala Leu Phe Lys
450 455 460

Glu Leu Asp Lys Asn Gly Thr Gly Ser Val Thr Phe Asp Glu Phe Ala
465 470 475 480

Ala Trp Ala Ser Ala Val Lys Leu Asp Ala Asp Gly Asp Pro Asp Asn
485 490 495

Val Pro Glu Ser Pro Arg Pro Met Gly Ile
500 505

<210> 3

<211> 66

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 3

10

ggtgacaaac catcaccatt tggacaggcc gcagcagggtg acaaaccatc accatttgga 60
caggcc 66

<210> 4

<211> 22

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 4

Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro
1 5 10 15

Ser Pro Phe Gly Gln Ala
20

<210> 5
<211> 1557
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
10 <400> 5

```

gatccaacgt atcgttttgc aaaccacgcg ttcacgctgg tggcgctcgg gacgattcac 60
gaggttccga gcgtcgcgag tcctttgctg ggtgcgagcc tggactcttc tgggtggcaaa 120
aaactcctgg ggctctcgta cgacgagaag caccagtggc agccaatata cggatcaacg 180
ccggtgacgc cgaccggatc gtgggagatg ggtaagaggt accacgtggg tcttacgatg 240
gcgaataaaa ttggctccgt gtacattgat ggagaacctc tggagggttc agggcagacc 300
gttggtgccag acgagaggac gcctgacatc tccacttct acgttggcgg gtatggaagg 360
agtgatatgc caaccataag ccacgtgacg gtgaataatg ttcttcttta caaccgtcag 420
ctgaatgccg aggagatcag gaccttgctt ttgagccagg acctgattgg cacggaagca 480
cacatgggca gcagcagcgg cagcagtgcc caccgtacgc cctcgattcc cgttgacagc 540
agtgtccacg gtacaccctc gactcccgtt gacagcagtg cccacggtac gccctcgact 600
cccgttgaca gcagtgccca cgttacaccc tcgactcccg ttgacagcag tgcccacggg 660
acaccctcga ctcccgttga cagcagtgcc caccgtaagc cctcgactcc cgctgacagc 720
agtgtccaca gtacgcccct gactcccgtt gacagcagtg cccacagtac gccctcaatt 780
cccgttgaca gcagtgccca cagtacgccc tcagctcccg ctgacaacgg cgccaatggg 840
acgggtttga tttgtgcgac tcatgacgcg tacaggcccg ttgatccctc ggcgtacaag 900
cgcgcccttg cgacggaaga gcaagaggat gtggggccgc gccacgttga tcccgaaccac 960
ttccgctcga cctcgacgac tcatgacgcg tacaggcccg ttgatccctc ggcgtacaag 1020
cgcgcccttg cgacggaaga gcaagaggat gtggggccgc gccacgttga tcccgaaccac 1080
ttccgctcga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1140
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1200
tcgacctcga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1260
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1320
tcgacctcga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1380
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1440
tcgacgactc atgacgcgta caggcccgtt gatccctcgg cgtacaagcg cgccttgccg 1500
caggaagagc aagaggatgt ggggccgcgc caccgttgatc ccgaccactt ccgctcgg 1557

```

<210> 6
<211> 519
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
<400> 6

ES 2 539 026 T3

Asp	Pro	Thr	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asn	His	Ala	Phe	Thr	Leu	Val	Ala	Ser	1	5	10	15
Val	Thr	Ile	His	Glu	Val	Pro	Ser	Val	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	20	25	30	
Ser	Leu	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp	35	40	45	
Glu	Lys	His	Gln	Trp	Gln	Pro	Ile	Tyr	Gly	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Pro	50	55	60	
Thr	Gly	Ser	Trp	Glu	Met	Gly	Lys	Arg	Tyr	His	Val	Val	Leu	Thr	Met	65	70	75	80
Ala	Asn	Lys	Ile	Gly	Ser	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Gly	85	90	95	
Ser	Gly	Gln	Thr	Val	Val	Pro	Asp	Glu	Arg	Thr	Pro	Asp	Ile	Ser	His	100	105	110	
Phe	Tyr	Val	Gly	Gly	Tyr	Gly	Arg	Ser	Asp	Met	Pro	Thr	Ile	Ser	His	115	120	125	
Val	Thr	Val	Asn	Asn	Val	Leu	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Ala	Glu	130	135	140	
Glu	Ile	Arg	Thr	Leu	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Glu	Ala	145	150	155	160
His	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Ile	165	170	175	
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	180	185	190	
Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	195	200	205	
Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	210	215	220	
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser	225	230	235	240
Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser	245	250	255	
Thr	Pro	Ser	Ile	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Ala	260	265	270	
Pro	Ala	Asp	Asn	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Ile	Leu	Ser	Thr	His	275	280	285	
Asp	Ala	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Tyr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	290	295	300	
Gln	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Val	Gly	Pro	Arg	His	Val	Asp	Pro	Asp	His	305	310	315	320

Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro
325 330 335

Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly
340 345 350

Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala
355 360 365

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
370 375 380

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala
405 410 415

Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg
420 425 430

His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala
435 440 445

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
450 455 460

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
465 470 475 480

Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
485 490 495

Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
500 505 510

Asp Pro Asp His Phe Arg Ser
515

<210> 7
<211> 213
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
10 <400> 7

atggagtcag gagcgtcaga tcagctgctc gagaaggacc cgcgtcagga acgcgaagga 60
gattgctgcg cttgaggaga gtcattgaatg cccgcgcat caggagctgg cgcgcgagaa 120
gaagcttgcc gaccgcgcgt tccttgactc agaagccgga ggcggtgccg ctggctgacg 180
tgccgctcga cgacgatcag cgactttgtt gcg 213

<210> 8
15 <211> 68
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
<400> 8

Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn
1 5 10 15
Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln
20 25 30
Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln
35 40 45
Lys Pro Glu Arg Val Pro Leu Ala Asp Val Pro Leu Asp Asp Asp Ser
50 55 60
Asp Phe Val Ala
65

<210> 9
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
<400> 9

tacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ccacttggct 120
tggtatcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cgctctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttatttct gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacattcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
<400> 10

Tyr Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 11
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
<400> 11

```

gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gtctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtactat catctattat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
ctgcaaatga ccggtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaccgtc 300
tactatgatt acgacgacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
tcctca

```

<210> 12
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 12

```

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Phe
          20          25          30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
          65          70          75          80

Leu Gln Met Thr Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Pro Leu Tyr Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
          100          105          110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 13
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 13

```

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gcaggtcact 60
atgagctgca aatccagtcg gagtctgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaaacaatc ttataatctg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa

```

<210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 14

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Gln Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 360
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
10 <400> 15

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagttgagg 120
cctggacaag gccttgaatg gattggtatg attgatcctt cagacagtga aacttactac 180
gatcaagtat tcaaggacaa ggccacattg actgttgaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatggatt 300
acgactgatt cctatactat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 16
<211> 120
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
20 <400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Tyr Tyr Asp Gln Val Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
 <211> 335
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 17

```
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaaccctat ttacattggg 120
acctgcagaa gccaggccag tctccaaagc tcctgatcta caaagtttcc aaccgatttt 180
ctgggggtccc agacagggttc agtggcagtg gatcagggac agatttcaca ctcaagatca 240
gcagagtgga ggctgaggat ctgggagttt atttctgctc tcaaagtaca catgttcctc 300
cgacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaa 335
```

10 <210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 18

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
  1           5           10           15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
           65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110
```

20 <210> 19
 <211> 359
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 19

```
cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactggg tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatcggagtg attgatcctt ctgatagtta tactagctac 180
aatcaaaagt tcaagggcaa ggcacatta ctgtagacac atcctccagc acagcctaca 240
tgcagctcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtaca agacactatg 300
atttcgacag ctggtacttc gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctca 359
```

30 <210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 20

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
		20						25					30		
Trp	Val	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Thr	Arg	His	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala
		100						105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115					120									

- 5 <210> 21
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 21

```

tggagtttgg gctgagctgg ctttttcttg tcgcgatttt aaaaggtgtc cagtgcgatg 60
tgcagctggg ggagctctgg ggaggcttag tgcagcctgg aggggtcccg aaactctcct 120
gtgcagcctc tggattcact ttcagtgctt ttggaatgca ctgggttcgt caggctccag 180
agaaggggct ggagtggggt gcatacatta gtagtggcag tactatcatc tattatgcag 240
acacagtga gggccgattc accatctcca gagacaatcc caagaacacc ctgttcctgc 300
aatgaccgg tctaaggtct gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga ccgctctact 360
atgattacga cgactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct 420
cagcgtcgac caagggccca tcggtcttcc ccttggcacc ctctccaag agcacctctg 480
ggggcacagc ggccctgggc tgctgtgtca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt 540
cgtggaactc aggcgcctcg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct 600
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga 660
cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc 720
ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctctgggg 780
gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc 840
ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact 900
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca 960
acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca 1020
aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaa gctctcccag ccccatcgag aaaaccatct 1080
ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgcgagg 1140
agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggttcttat cccagcgaca 1200
tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc 1260
tgctggactc cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt 1320
ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 1380
cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 1415

```

- 15 <210> 22
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 22

tcatttacc	ggagacaggg	agaggctctt	ctgcgtgtag	tggttgtgca	gagcctcatg	60
catcacggag	catgagaaga	cgttcccctg	ctgccacctg	ctcttgtcca	cggtagagctt	120
gctgtagagg	aagaaggagc	cgtcggagtc	cagcacggga	ggcgtggtct	tgtagttgtt	180
ctccggctgc	ccattgctct	cccactccac	ggcgtatgctg	ctgggataga	agcctttgac	240
caggcaggtc	aggctgacct	ggttcttggg	catctcctcg	cgggatgggg	gcagggtgta	300
cacctgtggt	tctcggggct	gccctttggc	tttggagatg	gttttctcga	tgggggctgg	360
gagggctttg	ttggagacct	tgcacttgta	ctccttgcca	ttcagccagt	cctgggtgcag	420
gacggtgagg	acgctgacca	cacggtacct	gctgttgtag	tgtctcctcc	gcggctttgt	480
cttggcatta	tgcacctcca	cgcgtccac	gtaccagttg	aacttgacct	cagggtcttc	540
gtggctcacg	tccaccacca	cgcgtgtgac	ctcaggggtc	cgggatgaca	tgagggtgtc	600
cttgggtttt	ggggggaaga	ggaagactga	cgggtccccc	aggagttag	gtgctgggca	660
cgggtgggcat	gtgtgagttt	tgtcacaaga	tttgggctca	actttcttgt	ccaccttggg	720
gttgcgtggg	ttgtgattca	cgttgagatg	gtaggtctgg	gtgcccagc	tgctggagg	780
cacggtcacc	acgctgctga	gggagtagag	tcctgaggac	tgtaggacag	ccgggaaggt	840
gtgcacggcg	ctggtcagg	cgcctgagtt	ccacgacacc	gtcaccggtt	cggggaagta	900
gtccttgacc	aggacgcca	gggcccgtgt	gccccagag	gtgctcttgg	aggagggtgc	960
cagggggaag	accgatggg	ccttgggtcga	cgtgaggag	acggtgactg	aggttccttg	1020
acccagtag	tccatagcat	agtgcgtcga	atcatagtag	agcgttcttg	cacagtaata	1080
catggccgtg	tcctcagacc	ttagaccggt	catttgacag	aacagggtgt	tcttgggatt	1140
gtctctggag	taagtgaatc	ggcccttcac	tgtgtctgca	taatagatga	tagtactgcc	1200
actactaatg	tatgcgacc	actccagccc	cttctctgga	gcctgacgaa	cccagtgcac	1260
tccaaagaca	ctgaaagtga	atccagaggc	tgcacaggag	agtttccggg	accctccagg	1320
ctgcactaag	cctccccag	actccaccag	ctgcacatcg	cactggacac	ctttttaa	1380
cgcgacaaga	aaaagccagc	tcagcccaaa	ctcca			1415

<210> 23
 <211> 725
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 23

tggacatgog	cgtgcccgcc	cagctgctgg	gcctgctgct	gctgtggttc	cccggctcgc	60
gatgctacat	tgtgatgtca	cagtctccat	cctccctggc	tgtgtcagca	ggagagaagg	120
tcactatgag	ctgcaaatcc	agtcagagtc	tgtcacaacg	tagaaccgga	aagaaccact	180
tggcttggtg	tcagcagaaa	ccagggcagt	ctcctaaact	gctgatctac	tgggcatcca	240
ctagggaatc	tgggtccct	gatcgcttca	caggcagtgg	atctgggaca	gatttcgctc	300
tcaccatcag	cagtgtgcag	gctgaagacc	tggcagttta	tttctgcaag	caatcttata	360
atctgtacac	attcgggtgct	gggaccaagc	tggagctgaa	acgtacggtg	gctgcaccat	420
ctgtcttcat	cttcccgcga	tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	480
gcctgctgaa	taacttctat	cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	540
tccaatcggg	taactcccag	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	600
gcctcagcag	caccctgacg	ctgagcaaa	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	660
gcgaagtac	ccatcagggc	ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	720
gttga						725

<210> 24
 <211> 725
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 24

tcaacactct	cccctgttga	agctctttgt	gacgggagag	ctcaggccct	gatgggtgac	60
ttcgcaggcg	tagactttgt	gtttctcgtg	gtctgctttg	ctcagcgtca	gggtgctgct	120
gaggctgtag	gtgctgtcct	tgtctgtcctg	ctctgtgaca	ctctcctggg	agttaccoga	180
ttggaggggc	ttatccacct	tccactgtac	tttggcctct	ctgggataga	agttattcag	240
caggcacaca	acagaggcag	ttccagattt	caactgctca	tcagatggcg	ggaagatgaa	300
gacagatggt	gcagccaccg	tacgtttcag	ctccagcttg	gtcccagcac	cgaatgtgta	360
cagattataa	gattgcttgc	agaaataaac	tgccaggtct	tcagcctgca	cactgctgat	420
ggtgagagcg	aaatctgtcc	cagatccact	gcctgtgaag	cgatcaggga	ccccagattc	480
cctagtggat	gcccagtaga	tcagcagttt	aggagactgc	cctggtttct	gctgatacca	540
agccaaagtgg	ttcttttcggg	ttctactgtt	gagcagactc	tgactggatt	tgacgtcat	600
agtgaccttc	tctcctgctg	acacagccag	ggaggatgga	gactgtgaca	tcacaatgta	660
gcatcgcgag	ccgggggaacc	acagcagcag	caggcccagc	agctgggcgg	gcacgcgcat	720
gtcca						725

	<210> 25	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> polinucleótido sintético	
	<400> 1	
	gacatccaga tggaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60	
	atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttgggtta gctggtacca gcagaaacca 120	
	ggaaatattc ctaaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180	
	aggtttagtg gcagtggatc tggaaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240	
	gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atcctctcac gttcggctcg 300	
	gggcgaaagt tggaaataaa a 321	
10	<210> 26	
	<211> 107	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> polipéptido sintético	
	<400> 2	
	Asp Ile Gln Met Asp Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp	
	20 25 30	
	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu	
	85 90 95	
20	Thr Phe Gly Ser Gly Arg Lys Leu Glu Ile Lys	
	100 105	
	<210> 27	
	<211> 354	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> polinucleótido artificial	
	<400> 3	
30	gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60	
	tcctgcacag cttctggcct caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg 120	
	cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtta tactaaatat 180	
	gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acaacagaca catcctcaa cacagcctac 240	
	ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tacctcctac 300	
	tatggttaact acgttgctta ctggggccac gggactctgg tcactgtctc tgca 354	
	<210> 28	
	<211> 118	
35	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido artificial	
	<400> 4	

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Tyr Tyr Gly Asn Tyr Val Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<110> ABBOTT LABORATORIOS Brophy, SUSAN E. Hawksworth, DAVID SHAH, DINESH O. Siegel, ROBERT W. Tieman, BRYAN c.TU, Bailin TYNER, JOAN D. ZIEMANN, ROBERT N.

<120> ANTI-T. CRUZI ANTICUERPOS Y MÉTODOS DE USO

<130> 8506WOO1

<140>

<141>

<150> 61/017,071<151> 2007-12-27

<150>

<151> 2008-12-23

<160> 28

<170> PatentIn Ver.3.3

<210> 1

<211> 1518

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 1

atggcccagc tccaacaggc agaaaataat atcactaatt ccaaaaaaga aatgacaaaag 60
ctacgagaaa aagtgaaaaa ggccgagaaa gaaaaattgg acgccattaa ccgggcaacc 120
aagctggaag aggaacgaaa ccaagcgtac aaagcagcac acaaggcaga ggaggaaaag 180
gctaaaacat ttcaacgcct tataacattt gactcggaat atattaactt aaagaaaagg 240
ccaaatgacg cagtttcaaa tcgggataag aaaaaaatt ctgaaaccgc aaaaactgac 300
gaagtagaga aacagagggc ggctgaggct gccaaaggcc tggagacgga gaagcagagg 360
gcagctgagg ccacgaaggt tgccgaagcg gagaagcgga aggcagctga ggccgccaag 420
gccgtggaga cggagaagca gagggcagct gaagccacga aggttgccga agcggagaag 480
cagaaggcag ctgaggccgc caaggccgtg gagacggaga agcagagggc agctgaagcc 540
acgaagggtg ccgaagcgga gaagcagagg gcagctgaag ccatgaaggt tgccgaagcg 600
gagaagcaga aggcagctga ggccgccaag gccgtggaga cggagaagca gagggcagct 660
gaagccacga aggttgccga agcggagaag cagaaggcag ctgaggccgc caaggccgtg 720
gagacggaga agcagagggc agctgaagcc acgaagggtg ccgaagcgga gaagcagaag 780
gcagctgagg ccgccaaggc cgtggagacg gagaagcaga gggcagctga agccacgaag 840
gttgccgaag cggagaagga tatcgatccc atgggtgctt gtgggtcgaa ggactcgacg 900
agcgacaagg ggttgccgag cgataaggac ggcaagaacg ccaaggaccg caaggaaagc 960
tgggagcgca ttcgccaggc gattcctcgt gagaagaccg ccgaggcaaa acagcgccgc 1020
atcgagctct tcaagaagtt cgacaagaac gagaccggga agctgtgcta cgatgagggt 1080
cacagcggct gcctcgaggt gctgaagttg gacgagttca cgccgcgagt gcgcgacatc 1140
acgaagcgtg cattcgacaa ggcgagggcc ctgggcagca agctggagaa caagggtccc 1200
gaggactttg ttgaatttct ggagttccgt ctgatgctgt gctacatcta cgacttcttc 1260
gagctgacgg tgatgttcga cgagattgac gcctccggca acatgctggt tgacgaggag 1320

gagttcaagc ggcgcgtgcc caggcttgag gcgtagggcg ccaaggtcga ggatcccgcg 1380
 ggcgtgttca aggagctcga taagaacggc actgggtccg tgacgttcga cgagtttgct 1440
 gcgtagggctt ctgcagtcaa actggacgcc gacggcgacc cggacaacgt gccggagagc 1500
 ccgagaccga tgggaatc 1518

<210> 2

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 2

10

Met	Ala	Gln	Leu	Gln	Gln	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	1	5	10	15
Glu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Glu	Lys	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	20	25	30	
Leu	Asp	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	Thr	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Gln	35	40	45	
Ala	Tyr	Lys	Ala	Ala	His	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Phe	50	55	60	
Gln	Arg	Leu	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Glu	Asn	Ile	Asn	Leu	Lys	Lys	Arg	65	70	75	80
Pro	Asn	Asp	Ala	Val	Ser	Asn	Arg	Asp	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Glu	Thr	85	90	95	
Ala	Lys	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	100	105	110	
Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	115	120	125	
Glu	Ala	Glu	Lys	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	130	135	140	
Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	145	150	155	160
Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	165	170	175	
Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	180	185	190	
Glu	Ala	Met	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	195	200	205	
Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	210	215	220	
Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	225	230	235	240
Glu	Thr	Glu	Lys	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	245	250	255	

ES 2 539 026 T3

Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys
260 265 270
Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Asp Ile
275 280 285
Asp Pro Met Gly Ala Cys Gly Ser Lys Asp Ser Thr Ser Asp Lys Gly
290 295 300
Leu Ala Ser Asp Lys Asp Gly Lys Asn Ala Lys Asp Arg Lys Glu Ala
305 310 315 320
Trp Glu Arg Ile Arg Gln Ala Ile Pro Arg Glu Lys Thr Ala Glu Ala
325 330 335
Lys Gln Arg Arg Ile Glu Leu Phe Lys Lys Phe Asp Lys Asn Glu Thr
340 345 350
Gly Lys Leu Cys Tyr Asp Glu Val His Ser Gly Cys Leu Glu Val Leu
355 360 365
Lys Leu Asp Glu Phe Thr Pro Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys Arg Ala
370 375 380
Phe Asp Lys Ala Arg Ala Leu Gly Ser Lys Leu Glu Asn Lys Gly Ser
385 390 395 400
Glu Asp Phe Val Glu Phe Leu Glu Phe Arg Leu Met Leu Cys Tyr Ile
405 410 415
Tyr Asp Phe Phe Glu Leu Thr Val Met Phe Asp Glu Ile Asp Ala Ser
420 425 430
Gly Asn Met Leu Val Asp Glu Glu Glu Phe Lys Arg Ala Val Pro Arg
435 440 445
Leu Glu Ala Trp Gly Ala Lys Val Glu Asp Pro Ala Ala Leu Phe Lys
450 455 460
Glu Leu Asp Lys Asn Gly Thr Gly Ser Val Thr Phe Asp Glu Phe Ala
465 470 475 480
Ala Trp Ala Ser Ala Val Lys Leu Asp Ala Asp Gly Asp Pro Asp Asn
485 490 495
Val Pro Glu Ser Pro Arg Pro Met Gly Ile
500 505

<210> 3

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 3

gggtgacaaac catcaccatt tggacaggcc gcagcagggtg acaaaccatc accatttggga 60
caggcc 66

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 4

Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro
1 5 10 15

Ser Pro Phe Gly Gln Ala
20

<210> 5

<211> 1557

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 5

10

```

gatccaacgt atcggttttgc aaaccacgcg ttcacgctgg tggcgctcgg gacgattcac 60
gaggttccga gcgtcgcgag tcctttgctg ggtgcgagcc tggactcttc tgggtggcaaa 120
aaactcctgg ggctctcgta cgacgagaag caccagtggc agccaatata cggatcaacg 180
ccggtgacgc cgaccggatc gtgggagatg ggtaagaggt accacgtggt tcttacgatg 240
gcgaataaaa ttggctccgt gtacattgat ggagaacctc tggagggttc agggcagacc 300
gttgtgccag acgagaggac gcctgacatc tcccacttct acgttggcgg gtatggaagg 360
agtgatatgc caaccataag ccacgtgacg gtgaataatg ttcttcttta caaccgtcag 420
ctgaatgccg aggagatcag gaccttggtc ttgagccagg acctgattgg cacggaagca 480
cacatgggca gcagcagcgg cagcagtgcc cacggtacgc cctcgattcc cgttgacagc 540
agtgcccacg gtacaccctc gactcccgtt gacagcagtg cccacggtac gccctcgact 600
cccgttgaca gcagtgccca cggtagaccc tcgactcccg ttgacagcag tggccacggt 660
acaccctoga ctcccgttga cagcagtgcc cacggtgaagc cctcgactcc cgctgacagc 720
agtgcccaca gtacgccctc gactcccgtt gacagcagtg cccacagtag gccctcaatt 780
cccgtgaca gcagtgccca cagtacgccc tcagctcccg ctgacaacgg cgccaatggt 840
acggttttga ttttgtcgac tcatgacgcg tacaggcccg ttgatccctc ggcgtacaag 900
cgcgcttgc cgcaggaaga gcaagaggat gtggggccgc gccacgttga tcccgaccac 960
ttccgctoga cctcgacgac tcatgacgcg tacaggcccg ttgatccctc ggcgtacaag 1020
cgcgcttgc cgcaggaaga gcaagaggat gtggggccgc gccacgttga tcccgaccac 1080
ttccgctoga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1140
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1200
tcgacctoga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1260
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1320
tcgacctoga cgactcatga cgcgtacagg cccgttgatc cctcggcgta caagcgcgcc 1380
ttgccgcagg aagagcaaga ggatgtgggg ccgcgccacg ttgatcccga ccacttccgc 1440
tcgacgactc atgacgcgta caggcccgtt gatccctcgg cgtacaagcg cgccttgccg 1500
caggaagagc aagaggatgt ggggccgcgc cacgttgatc ccgaccactt ccgctcgg 1557

```

<210> 6

<211> 519

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 6

ES 2 539 026 T3

Asp	Pro	Thr	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asn	His	Ala	Phe	Thr	Leu	Val	Ala	Ser	1	5	10	15
Val	Thr	Ile	His	Glu	Val	Pro	Ser	Val	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Gly	Ala	20	25	30	
Ser	Leu	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp	35	40	45	
Glu	Lys	His	Gln	Trp	Gln	Pro	Ile	Tyr	Gly	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Pro	50	55	60	
Thr	Gly	Ser	Trp	Glu	Met	Gly	Lys	Arg	Tyr	His	Val	Val	Leu	Thr	Met	65	70	75	80
Ala	Asn	Lys	Ile	Gly	Ser	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	Gly	85	90	95	
Ser	Gly	Gln	Thr	Val	Val	Pro	Asp	Glu	Arg	Thr	Pro	Asp	Ile	Ser	His	100	105	110	
Phe	Tyr	Val	Gly	Gly	Tyr	Gly	Arg	Ser	Asp	Met	Pro	Thr	Ile	Ser	His	115	120	125	
Val	Thr	Val	Asn	Asn	Val	Leu	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Ala	Glu	130	135	140	
Glu	Ile	Arg	Thr	Leu	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Glu	Ala	145	150	155	160
His	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Ile	165	170	175	
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	180	185	190	
Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	195	200	205	
Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Thr	Pro	Ser	Thr	210	215	220	
Pro	Val	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser	225	230	235	240
Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser	245	250	255	
Thr	Pro	Ser	Ile	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	Ala	His	Ser	Thr	Pro	Ser	Ala	260	265	270	
Pro	Ala	Asp	Asn	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Ile	Leu	Ser	Thr	His	275	280	285	
Asp	Ala	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Tyr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	290	295	300	
Gln	Glu	Glu	Gln	Glu	Asp	Val	Gly	Pro	Arg	His	Val	Asp	Pro	Asp	His	305	310	315	320

ES 2 539 026 T3

Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro
325 330 335

Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly
340 345 350

Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala
355 360 365

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
370 375 380

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala
405 410 415

Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg
420 425 430

His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala
435 440 445

Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu
450 455 460

Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg
465 470 475 480

Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
485 490 495

Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
500 505 510

Asp Pro Asp His Phe Arg Ser
515

<210> 7
<211> 213
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
<400> 7

10 atggagtcag gagcgtcaga tcagctgctc gagaaggacc cgcgtcagga acgcgaagga 60
gattgctgcg cttgaggaga gtcattgaatg cccgcgtcat caggagctgg cgcgcgagaa 120
gaagcttgcc gaccgcgcgt tccttgactc agaagccgga gcgcgtgccg ctggctgacg 180
tgccgctcga cgacgatcag cgactttgtt gcg 213

<210> 8
<211> 68
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
<400> 8

Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys Asp Pro Arg Arg Asn
1 5 10 15

Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln
20 25 30

Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln
35 40 45

Lys Pro Glu Arg Val Pro Leu Ala Asp Val Pro Leu Asp Asp Asp Ser
50 55 60

Asp Phe Val Ala
65

<210> 9

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 9

tacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ccacttggct 120
tggtatcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgacgc cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cgctctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttatttct gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacattcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 10

Tyr Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 11

```

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gtctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
ccagagaagg ggctggagtg ggctcgcatc attagtagtg gcagtactat catctattat 180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240
ctgcaaatga ccggtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaccgctc 300
tactatgatt acgacgacta tgctatggac tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360
tcctca 366

```

<210> 12

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 12

10

```

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1           5           10           15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Phe
          20           25           30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Thr Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
          50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
          65           70           75           80

Leu Gln Met Thr Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Arg Pro Leu Tyr Tyr Asp Tyr Asp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
          100          105          110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 13

<211> 336

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético

<400> 13

20

```

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gcaggtcact 60
atgagctgca aatccagtcg gactctgttc aacagtagaa ccgaaagaa ctacttggct 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaaacaatc ttataatctg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

```

<210> 14

<211> 112

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 14

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Gln Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 360
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
10 <400> 15

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgaggc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagttgagg 120
cctggacaag gccttgaatg gattggtatg attgatcctt cagacagtga aacttactac 180
gatcaagtat tcaaggacaa ggccacattg actgttgaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagatggatt 300
acgactgatt cctatactat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 16
15 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
20 <400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Tyr Tyr Asp Gln Val Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Ile Thr Thr Asp Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
 <211> 335
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 17

```

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaaccctat ttacattggg 120
acctgcagaa gccaggccag tctccaaagc tcctgatcta caaagtttcc aaccgatttt 180
ctgggggtccc agacagggttc agtggcagtg gatcagggac agatttcaca ctcaagatca 240
gcagagtggg ggctgaggat ctgggagttt atttctgctc tcaaagtaca catgttcctc 300
cgacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaaa 335

```

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 18

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1          5          10          15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
          65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
          85          90          95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 19
 <211> 359
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 19

```

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactggg tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatcggagtg attgatacct ctgatagtta tactagctac 180
aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacatta ctgtagacac atcctccagc acagcctaca 240
tgcagctcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtaca agacactatg 300
atttcgacag ctggtacttc gatgtctggg gcgcagggac cacggtcacc gtctcctca 359

```

<210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético
 <400> 20

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Val	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65				70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	His	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

- 5 <210> 21
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 21

```

tggagtttgg gctgagctgg ctttttcttg tgcgattttt aaaaggtgtc cagtgcgatg 60
tgcagctggg ggagtctggg ggaggcttag tgcagcctgg aggggtcccg aaactctcct 120
gtgcagcctc tggattcact ttcagtgtct ttggaatgca ctgggttcgt caggctccag 180
agaagggggt ggagtgggtc gcatacatta gtagtggcag tactatcatc tattatgcag 240
acacagtga gggccgattc accatctcca gagacaatcc caagaacacc ctgttcctgc 300
aatgaccgg tctaaggtct gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga ccgctctact 360
atgattacga cgactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct 420
cagcgtcgac caagggccca tcgggtcttc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg 480
ggggcacagc ggcctggggc tgcctggta aggactact cccgaaccg gtgacggtgt 540
cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacct cccggctgtc ctacagtcct 600
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga 660
cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagtggagc 720
ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg 780
gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct 840
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact 900
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca 960
acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca 1020
aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct 1080
ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgcgagg 1140
agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggttctat cccagcgaca 1200
tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc 1260
tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt 1320
ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 1380
cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 1415

```

- 15 <210> 22
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 22

tcatttacc	ggagacaggg	agaggtctct	ctgctgttag	tggttgtgca	gagcctcatg	60
catcacggag	catgagaaga	cggtccctctg	ctgccacctg	ctcttgtcca	cggtgagctt	120
gctgtagagg	aagaaggagc	cgctcgagtc	cagcacggga	ggcgtggtct	tgtagttgtt	180
ctccggctgc	ccattgctct	cccactccac	ggcgatgtcg	ctgggataga	agcctttgac	240
caggcaggtc	aggctgacct	ggttcttggg	catctcctcg	cgggatgggg	gcagggtgta	300
cacctgtggt	tctcggggct	gccctttggc	tttgagatg	gttttctcga	tgggggctgg	360
gagggctttg	ttggagacct	tgcacttgta	ctccttgcca	ttcagccagt	cctggtgcag	420
gacggtgagg	acgctgacca	cacggtacgt	gctgttgtag	tgtcctccc	gcggtttgt	480
cttggtcatta	tgcacctcca	cgccgtccac	gtaccagttg	aacttgacct	caggtcttc	540
gtggctcacg	tccaccacca	cgcatgtgac	ctcaggggtc	cgggagatca	tgagggtgtc	600
cttggtttt	ggggggaaga	ggaagactga	cggtccccc	aggagttcag	gtgctgggca	660
cggtgggcat	gtgtgagttt	tgtcacaaga	tttgggtcga	actttcttgt	ccaccttggt	720
gttgctgggc	ttgtgattca	cggtgcagat	gtaggtctgg	gtgcccagc	tgctggaggg	780
cacggtcacc	acgctgctga	gggagtagag	tcctgaggac	tgtaggacag	ccgggaaggt	840
gtgcacggcg	ctggtcaggg	cgccgtgagt	ccacgacacc	gtcaccggtt	cggggaagta	900
gtccttgacc	aggcagccca	gggcccgtgt	gccccagag	gtgctcttgg	aggaggtgtc	960
cagggggaag	accgatgggc	ccttggtcga	cgctgaggag	acggtgactg	aggttccttg	1020
acccagtag	tccatagcat	agtcgtcgta	atcatagtag	agcggctctg	cacagtaata	1080
catggccgtg	tcctcagacc	ttagaccggt	catttgacag	aacagggtgt	tcttgggatt	1140
gtctctggag	atggtgaatc	ggcccttcac	tgtgtctgca	taatagatga	tagtactgcc	1200
actactaatg	tatgcgaccc	actccagccc	cttctctgga	gcctgacgaa	cccagtgcac	1260
tccaaagaca	ctgaaagtga	atccagaggc	tgcacaggag	agtttccggg	accctccagg	1320
ctgcactaag	cctccccag	actccaccag	ctgcacatcg	cactggacac	cttttaaaat	1380
cgcgacaaga	aaaagccagc	tcagcccaaa	ctcca			1415

<210> 23
 <211> 725
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 23

tggacatg	cgtgcccgc	cagctgctgg	gcctgtgtct	gctgtggttc	cccggctcgc	60
gatgtacat	tgtgatgtca	cagtctccat	cctccctggc	tgtgtcagca	ggagagaagg	120
tcactatgag	ctgcaaatcc	agtcagagtc	tgtcaacag	tagaaccga	aagaaccact	180
tggcttggtg	tcagcagaaa	ccagggaagt	ctcctaaact	gctgatctac	tgggcatcca	240
ctagggaatc	tggggctcc	gatcgcttca	caggcagtg	atctgggaca	gatttcgctc	300
tcaccatcag	cagtgtgcag	gctgaagacc	tggcagttta	tttctgcaag	caatcttata	360
atctgtacac	attcggtgct	gggaccaagc	tggagctgaa	acgtacggtg	gctgcacat	420
ctgtcttcat	cttcccgcga	tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	480
gcctgtgtaa	taacttctat	cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagtg	gataacgcc	540
tccaatcggg	taactcccag	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	600
gcctcagcag	caccctgacg	ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	660
gcgaagtca	ccatcagggc	ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	720
gttga						725

<210> 24
 <211> 725
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: polinucleótido sintético
 <400> 24

tcaacactct	cccctgttga	agctctttgt	gacgggcgag	ctcaggccct	gatgggtgac	60
ttcgcaggcg	tagactttgt	gtttctcgta	gtctgctttg	ctcagcgtca	gggtgctgct	120
gaggctgtag	gtgctgtcct	tgtgtcctg	ctctgtgaca	ctctcctggg	agttaccga	180
ttggaggggc	ttatccacct	tccactgtac	tttggcctct	ctgggataga	agttattcag	240
caggcacaca	acagaggcag	ttccagattt	caactgctca	tcagatggcg	ggaagatgaa	300
gacagatggt	gcagccaccg	tacgtttcag	ctccagcttg	gtcccagcac	cgaatgtgta	360
cagattataa	gattgcttgc	agaaataaac	tgccaggctc	tcagcctgca	cactgctgat	420
ggtgagagcg	aaatctgtcc	cagatccact	gcctgtgaag	cgatcaggga	ccccagattc	480
cctagtggat	gcccagtaga	tcagcagttt	aggagactgc	cctggtttct	gctgatacca	540
agccaaagtg	ttcttttcgg	ttctactgtt	gagcagactc	tgactggatt	tgacgtcat	600
agtgaccttc	tctcctgctg	acacagccag	ggaggatgga	gactgtgaca	tcacaatgta	660
gcatcgcgag	ccgggggaacc	acagcagcag	caggcccagc	agctgggcgg	gcacgcgcat	720
gtcca						725

<210> 25
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> polinucleótido sintético
 <400> 1

```

gacatccaga tggaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgagaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca      180
agggttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atcctctcac gttcggctcg      300
gggcgaaagt tggaaataaa a                                     321
  
```

10 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> polipéptido sintético
 <400> 2

```

Asp Ile Gln Met Asp Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1          5          10          15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
          20          25          30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65          70          75          80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu
          85          90          95

20 Thr Phe Gly Ser Gly Arg Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
  
```

25 <210> 27
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> polinucleótido artificial
 <400> 3

30

```

gagggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg      60
tcctgcacag cttctgggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg      120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat      180
gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acaacagaca catcctcaa cacagcctac      240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tacctcctac      300
tatggttaact acgttgctta ctggggccac gggactctgg tcactgtctc tgca          354
  
```

35 <210> 28
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> polipéptido artificial
 <400> 4

ES 2 539 026 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de inmunodiagnóstico que comprende uno o más anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de *T. cruzi*, en donde dicho uno o más anticuerpos son específicos para el polipéptido FP3 de *T. cruzi* del SEQ ID NO: 2, y en donde dichos uno o más anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en:
 - 5 (i) un anticuerpo quimérico que tiene una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 12 y que tiene una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 10;
 - (ii) el anticuerpo quimérico expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8136; y
 - 10 (iii) el anticuerpo expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8139.
2. El reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho reactivo de inmunodiagnóstico comprende dos o más de dichos anticuerpos.
3. El reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dichos uno o más anticuerpos tienen al menos una constante de unión selecciona del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre $2,0 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ y $8,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre $3,3 \times 10^{-12} \text{ M}$ y $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$.
4. El reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho reactivo inmunodiagnóstico es un reactivo seleccionado del grupo que consiste en un reactivo de detección, un reactivo de normalización, y un reactivo de control positivo.
5. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido FP3 de *T. cruzi* del SEQ ID NO: 2, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en
 - (i) un anticuerpo quimérico que tiene una región V_H que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 12 y que tiene una región V_L que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en el SEQ ID NO: 10;
 - 30 (ii) el anticuerpo quimérico expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8136; y
 - (iii) el anticuerpo expresado por la línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana con el Número de Acceso PTA-8139.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo tiene al menos una constante de unión seleccionada del grupo que consiste en: una constante de velocidad de asociación (k_a) entre $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; una constante de velocidad de disociación (k_d) entre $2,0 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ y $8,0 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$; y una constante de disociación en equilibrio (K_D) entre $3,3 \times 10^{-12} \text{ M}$ y $4,0 \times 10^{-9} \text{ M}$.
7. Una línea celular que expresa un anticuerpo quimérico que se une específicamente a un polipéptido de *T. cruzi*, en donde línea celular es una línea celular depositada en la Colección de Tejidos Tipo Americana y que tiene el Número de Acceso PTA-8136.
8. Un método de normalizar un análisis de detección de *T. cruzi* que comprende utilizar el reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 como panel de sensibilidad.
9. Un método para detectar un antígeno de *T. cruzi* que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de contener un antígeno de *T. cruzi* con el reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo quimérico:antígeno; y
 - 50 (b) detectar complejos de anticuerpo quimérico:antígeno cualesquiera formados como una indicación de la presencia de dicho antígeno de *T. cruzi*.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo quimérico comprende una marca detectable, o en donde los complejos de anticuerpo:antígeno se ponen en contacto con un anticuerpo secundario o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo secundario o fragmento del mismo comprende una marca detectable.
11. Un método para detectar un anticuerpo de *T. cruzi* que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra de análisis sospechosa de contener un anticuerpo de *T. cruzi* con un antígeno de *T. cruzi* específico para el anticuerpo de *T. cruzi* en condiciones que permiten la formación de complejos de antígeno:anticuerpo; y
 - 60 (b) detectar complejos de antígeno:anticuerpo cualesquiera formados como una indicación de la presencia de dichos antígenos de *T. cruzi*,

en donde el reactivo de inmunodiagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 se utiliza en dicho método como control positivo o reactivo de normalización, y
en donde el antígeno de *T. cruzi* es FP3.

- 5 12. Un kit de diagnóstico para la detección de *T. cruzi* que comprende el reactivo de inmunodiagnóstico de la reivindicación 1.

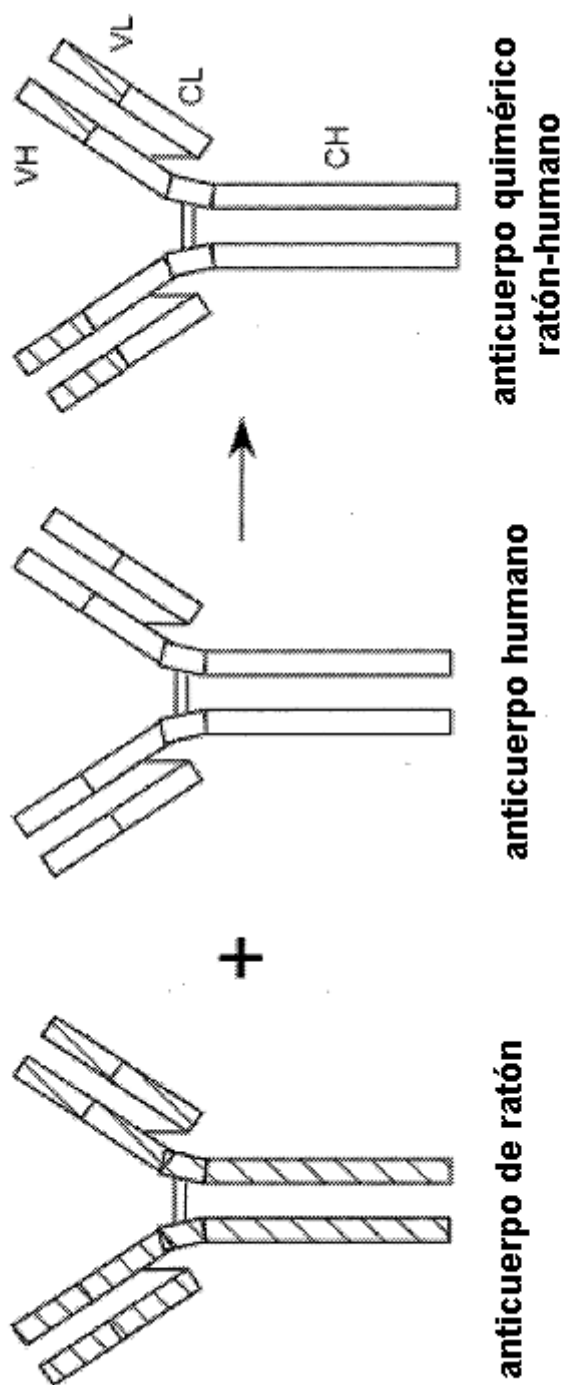


Figura 1

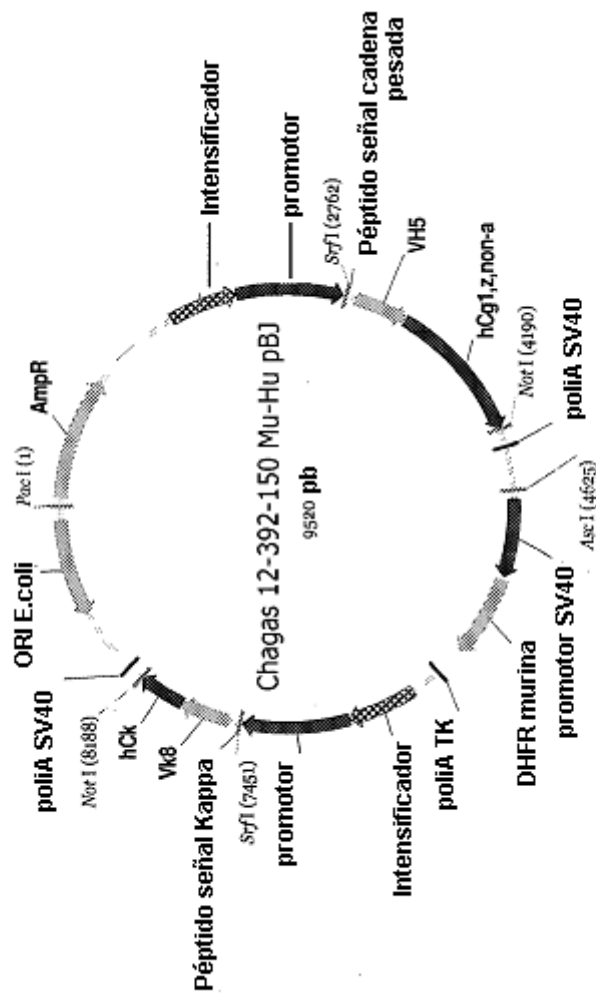


Figura 2

2701	péptido señal cadena pesada	===== TCGAGTTT GGGTCAAGT GCTTTTCT (SEQ ID NO.:21) ACCTCAA CCGACCTGA CCGAAAGA (SEQ ID NO.:22) VH5 =====
2801	péptido señal cadena pesada	===== TCGCGGATT TTAAAGTGG TCGAGTCCA TGTGAGCTG GGGGAGGTT AGTGAAGCT GAGAGCTCC GGAAGCTTC CTGTGAGCC ACAGGCTAA ATTTCGAC AGTCAGGCT AGAGCTGAC CACTGAGC CCGCTCGA TCACTGCA CTTCCAGG CTTTGGAG GACAGCTCG VH5 =====
2901		===== TCGGATICA CTTTCAGTGT CTTTGGATG CACTGGGTC GTGAGCTCC AGAGAGGGG CTGGAGTGG TGGATAGT TGGTATGG AGTACTATCA AGACTTAGT GAAAGTACA GAACTTAC GTAGCCGAG CAGTGGGGS TCTTTCCC GACTACCC AGCTATGTA ATCATACG TCATGATGT VH5 =====
3001		===== TCATATGCG AGACAGAGT AMGGGGAT TCAGCATTC CAGACGAT CCGAGTCT GGAAGACA CCGTCTCT GGAATGAG GGTCTAGGT CTGAGGAC AGATATAGG TCTGTGTG TTCCCGCTA AGTGGTAG CACTGCTA GGTCTGTA GGTCTTGT GGAAGAGA GGTCTAGT CAGATTCGA GACTCTGTG VH5 =====
3101		===== GGCATGTAT TACTGTGCA GACCGCTTA CTATGATAC GAGGCTATG CTAGGACTA CTGGGTTCA GGAAGCTG TCAGCTGTC CTGAGCTCG CGGTACATA ATCAGAGCTT CTGCGAGAT GATCTAATG CTGTGATAC GATACCTGT GAGCTCAGT CCTTGGATC AGTGGAGG GATGGCAGC NCgl.z, no 3 =====
3201		===== ACGAGGGCC CAGCGTCTT CCGCTGCG CACTCTGCA AGAGCACTC TGGGGGACA GCGGCTGAG GCTTCTCTGT CAGGCTATC TTCCGAC TGTTTCGCG GTAGCCAGA GGGGAGGCT GAGAGAGAT TCTGTGGG AGCCGCTGT CCGCGGACC GAGCGGACA GTTCGTATG AAGGGGCTT NCgl.z, no 3 =====
3301		===== CGGTAGGGT GTGTGAGC TCGAGGCTT TCGAGGCTT TTCCGCTG TCTTACAGT CTAGGACTT TACTCTCTA GCAAGCTGT GGCATGCA CAGGAGCTTG AGTCCGCG ACTGCTGCG GAGCTGTG AGGGGCGAC AGGATGTGAG GATCTCTGAG ATGAGGAGT CCGCGACA NCgl.z, no 3 =====
3401		===== GAGCTGCCC TCCAGGAGT TGGGACCA GACTACATC TGGAGCTGA ATGCAAGC CAGCACCC AAGGTGACA AGAAGTGA GCCCAATCT CTGGACGCG AGGTCTGCA ACCGTGGT CTGGATGAG AGTTGAGT TGGTGGG GTGTGTGG TTCCAGCTGT TCTTCACT CGGTTTGA =====

Figura 3A

3501hcg1, z, no a
 TGTGACAAA CTCACATAG CCCACCTGTC CCAGACCTG GAGACCTGCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCAAGGAC ACCCTCATGA
 ACGCTGTTTT GAGTGTTAT GGTGGCAGG GGTGCTGAC TTGAGGACCC CCGTGCAGT CAGAGGAGA AGGGGGTTT TGGGTCTG TGGGCTACT
hcg1, z, no a
 3601 TCTCCCGAC CCTGAGTTC ACATGGTGG TGGTGAAT GACACAGAA GACCTGAGG TCAGTTCGA CTGGTAGTG GACGGGTGG AGGTGCATAA
 AGAGGGCTTG GGGACTCCG TGTAGCGAC ACCACCTGCA CTGGGTGCT CTGGGCTCC AGTTCAGT GACCATGCC CTGCCGACC TCCAGGTATT
hcg1, z, no a
 3701 TGGCAGACA MAGCGCGGG AGGAGCAGTA CACAGCAGG TACGGTGGG TGGGTCTCT CACGTCTG CACGAGACT GGTGTAATG CAGGAGTAC
 ACGTTCTGT TTGCGCGCC TCTCTGTCAT GTTGTCTGC ATGACACACC AGTGCAGGA GTGGCAGAC GTGGTCTGA CGACTTAC GTTCTCATG
hcg1, z, no a
 3801 AGTGCAGG TCTCAGCA AGCCCTCCA CCCCCTATG AGAACCAT CTCGAGGCC MARGGCGC CCCGAGACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
 TTACGCTTC AGAGTTGTT TCGGAGGGT CCGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGTTTCCG TTTCCTGTG GGGCTCTTG TGTCCACATG TGGACCGGG
hcg1, z, no a
 3901 CATCCCGGA GGAGTACG AGGAGCAGG TCAGCTGAC CTGGCTGTC MARGCTTCT ATCCAGCGA CATGCTGTC GAGTGGAGA GCATGGCGA
 GTAGGGGCT CCTCTACTG TTCTTGTTC AGTGGACTG GACGAGCAG TTTCGAGGA TAGGTCTCT GTAGCGGAC CTCACCTCT GGTACCTCT
hcg1, z, no a
 4001 GCGGAGAAC AACTACAGA CACGGCTCC GGTGCTGAC TCGAGCGCT CTCTCTCT CTACAGCAG CTCACCTG ACAGGAGAG GTGGAGAG
 CGGCTCTTG TTGAGTTCT GTTGGGAGG GCAGGACTG AGCTGCGA GATGTCTTC GAGTGGACC TGTCTCTG CACCTGCTC
hcg1, z, no a
 4101 GGGAGCTCT TCTATGTC GTGATGCT GAGCTTGC ACACACTA CACGAGAG AGCTCTCC TGTCTCGG TAAATGA
 CCGTTGAGA AGAGTACAG GCACTACGTA CTCGAGAG TGTGTGAT GTGGCTTC TCGGAGAG ACAGGAGCC ATTACT

Figura 3B

	péptido señal Kappa	
7401	----- TEGACATCG CGTGCCGCG CAGCTGCTGG GCTGCTGCT (SEQ ID NO.:123) ACCTGTAGCG GCACGGGCGG GTGAGAGACC CGAGCGACGA (SEQ ID NO.:24) Vk8 -----	
7501	péptido señal Kappa ----- GCTGTGGTTC CCGGCTGCG GATGCTACAT TGTGATGTC CAGTCTCCAT CTTCCCTGGC TGCTATGAG CTGGAATCC CGACACGAG CGGCGGAGCG CTACAGTGA ACATAGAGT GTGAGAGTA GAGGAGACCG ACAGAGTGT CTTCTTCC AGTATACTC GACGTTTAG Vk8 -----	
7601	AGTCAGATC TGCTCAACAG TAGACCCGA AGAACCACT TGGTTGGTA TCAGAGAA CCGAGGAGT CTCTAAACT GCTGATCTAC TGGGATCCA TCAGTCTGAG ACGGTTTGTG ATCTTGGCT TTCTTGGTA ACCGACCACT AGTCTCTT GTTCCCGTCA GAGGATTTGA CGACTAGATG ACCGTAGGT Vk8 -----	
7701	CTAGGGAATC TGGGTCCT GATCGCTTCA CAGGCGTGG ATCTGGACA GATTGCTCT TCACATGAG CAGTGTGCG GCGAGACC TGGCAGTTTA GATCCCTTAG ACCCCAGGA CTAGCGAAGT GTCCGTCAAC TAGACCTGT CTAAAGCGAG AGTGGTAGTC GTACACAGTC CGACTTCTCG ACCGTCAAT Vk8 -----	
7801	TTTCTGCAAG CAATCTTATA ATCTGTACAC ATTGGTGCT GGGACGAGC TGGAGCTGAA ACGTACGGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCGCGCA AAGAGCTTC GTTAGAATAT TAGCATGTG TAAGCCAGCA CCTGTGTTG ACCTCGACT TCATGCTCCAC CGACGTGTA GACAGAGTA GAGGGGGGT hck -----	
7901	TCGTGAGC AGTTGAAATC TGGACTGCC TGTGTGTGT GCTGTGTA TAACTTCTAT CCCAGAGAG CCAAGATACA GTGGAGGTG GATAGCGCC AGACTACTCG TCACTTAG ACCTTACCG AGACAACACA CGGAGCACT ATTGAGATA GGGTCTCTCC GGTTCATGT CACCTTCCAC CTATTGCGG hck -----	
8001	TCGAATCGG TAACTCCGAG GAGAGTGTC CAGGCGAGA CAGCAAGAC AGCACCTACA GCTCAGCAG CACCTGAGC CTGAGCAAG CAGACTACGA AGGTTAGGCC ATTGAGGATC CTCTACAGT GTCTGCTCTG TGTGGATGT CGAGTGTG GTGGAGTGC GACTCTTTC GTCTGATGCT hck -----	
8101	GAAACACAA GTCTAGGCT ECGAGTCAC CCATCAGGCG CTGAGCTGCG CGGTACAAA GAGCTTCAC AGGGAGAGT GTTGA CTTTGTGTTT CAGATGCGGA CGCTTACGTG GGTAGTCCG GACTCGAGCG GCGAGTGT CTGAGATG TCCCTCTCA CAAT	

Figura 3C

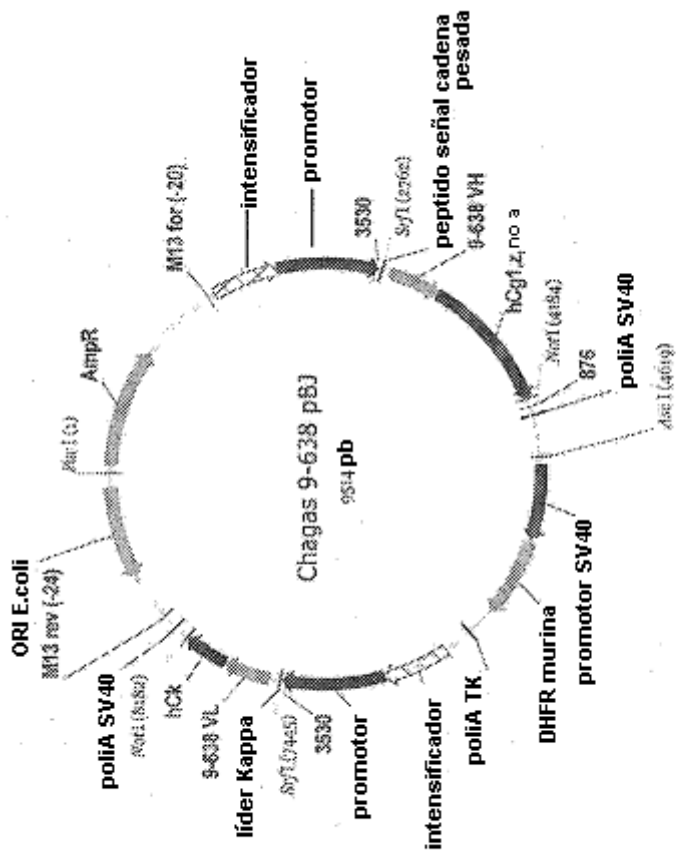


Figura 4

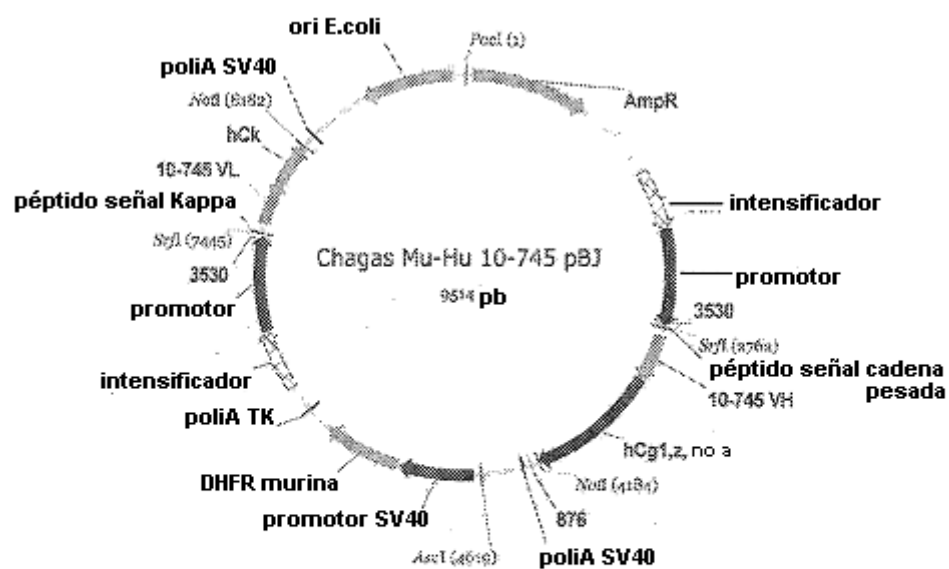


Figura 5