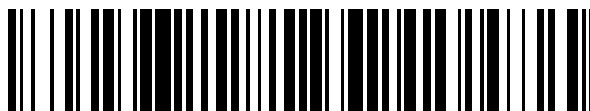


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 513**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2015** **E 15002958 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3156798**

54 Título: **Ensayo novedoso para el diagnóstico de infecciones helmínticas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

**UROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (50.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE y
UNIVERSITÄT BERN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHEPER, THOMAS;
MEYER, WOLFGANG;
SCHÖNFELD, LINDA;
GOTTSTEIN, BRUNO y
SPILIOTIS, MARKUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 513 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

Ensayo novedoso para el diagnóstico de infecciones helmínticas

- 5 La presente invención se refiere a un transportador útil en diagnóstico para capturar específicamente un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra del sujeto; un kit que comprende el transportador útil en diagnóstico, que preferentemente comprende además un medio para detectar cualquier anticuerpo capturado; un procedimiento para comprender la etapa de detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra de un sujeto; un uso de p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* o una variante del mismo para aumentar la fiabilidad del diagnóstico, preferentemente, la sensibilidad de un ensayo para la detección de una infección por *Echinococcus*, preferentemente para distinguir una infección por *Echinococcus multilocularis* de una infección por *Echinococcus granulosus*; un polipéptido que resulta con un peso molecular de 21 kDa procedente de *Echinococcus multilocularis*, que se puede obtener mediante la separación por pesos moleculares de un extracto procedente de *Echinococcus multilocularis* usando electroforesis en gel, o una variante del mismo, o un anticuerpo contra dicho polipéptido.
- 10 La infección por helmintos o la infección por gusanos, también conocida como helmintiasis, es una enfermedad macroparasítica que se puede transmitir a mamíferos tales como seres humanos, perros, zorros y lobos, caracterizada por la infección del cuerpo por helmintos tales como tenias del tipo *Echinococcus*. *E. granulosus* y *E. multilocularis* y dos de los principales parásitos del planeta. Más de un millón de personas se han infectado con uno de ellos en un momento dado.
- 15 Existen dos tipos principales de infecciones por *Echinococcus*, equinococcosis cística y equinococcosis alveolar. Las infecciones en seres humanos se producen tras la ingestión de huevos. Las larvas se liberan en el intestino del hospedador, penetran en las vellosidades intestinales y migran a varios órganos.
- 20 La enfermedad frecuentemente se inicia sin síntomas y estos pueden tardar un año. Los síntomas y signos que se producen posteriormente dependen de la situación y el tamaño del quiste. La enfermedad alveolar se inicia habitualmente en el hígado, pero después se disemina a otras partes del organismo tales como los pulmones o el cerebro. Cuando el hígado está afectado, la persona puede tener dolor abdominal, así como pérdida de peso, y presentar ictericia. La enfermedad pulmonar puede producir dolor torácico, dificultades respiratorias y tos. Sin tratamiento, las infecciones por *Echinococcus* pueden ser letales.
- 25 Como el paciente puede estar asintomático durante algún tiempo y resulta cada vez más difícil proporcionar un tratamiento eficaz a medida que la enfermedad progresa, son muy deseables herramientas fiables para el serodiagnóstico temprano de las infecciones helmínticas en seres humanos.
- 30 Los pacientes infectados con *Echinococcus* presentan una variedad de respuestas inmunitarias (Gottstein, B., Mesarina, B., Tanner, I., Ammann, R. W., Wilson, J. F., Eckert, J. Lanier, A. (1991): Specific Cellular and Humoral Immune Responses in Patients with Different Long-Term Courses of Alveolar Echinococcosis (Infection with *Echinococcus multilocularis*). Am. J. Trop Med. Hy. 45, 734-742.
- 35 Por lo tanto, los inmunoensayos convencionales basados en antígenos naturales, que se pueden extraer de gusanos completos o de cultivos *in vitro*, se pueden usar en inmunotransferencias para detectar anticuerpos del hospedador contra el parásito (Ayadi, a., Dutoit, B., Sendid, B., y Camus, D (1995): Specific Diagnostic Antigens of *Echinococcus granulosus* detected by Western Blot. Parasite 2, 119-123). Dichos dispositivos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de EUROIMMUN, Lubeck (Anti-*Echinococcus-granulosus* WESTERNBLOT).
- 40 Estos antígenos naturales tienen disponibilidad limitada, tienen variaciones de un lote a otro y carecen del grado de fiabilidad diagnóstica que sería deseable. Otros inconvenientes incluyen el hecho de que frecuentemente presentan reactividad cruzada, es decir, se reconocen por el suero de pacientes infectados con dos o más especies de helmintos.
- 45 Además de detectar *Echinococcus*, los parasitólogos tienen interés en distinguir material procedente de *E. granulosus* y *E. multilocularis*. Aunque las larvas de ambos parásitos se encuentran predominantemente en el hígado, sus distribuciones por el organismo del hospedador difieren en estadios del desarrollo posteriores, con implicaciones significativas para el tratamiento de los pacientes infectados. Por ejemplo, *E. granulosus* se encuentra con más frecuencia en el pulmón, mientras que *E. multilocularis* puede entrar tanto en el pulmón como en el cerebro del hospedador.
- 50 Por lo tanto, un problema subyacente en la presente invención es proporcionar un ensayo para detectar o ayudar en la detección de infecciones por *Echinococcus* que suponga una mejora comparado con los ensayos del estado de la técnica relativos a uno o más de sus diversos inconvenientes.
- 55 Otro problema subyacente en la presente invención es proporcionar un ensayo para la detección de *Echinococcus* que tenga mayor grado de fiabilidad, en términos de especificidad y sensibilidad, con respecto a la detección de infecciones por *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus* en comparación con los ensayos de la técnica.

Otro problema subyacente en la presente invención es proporcionar un ensayo que tenga mayor grado de fiabilidad con respecto a la distinción entre infecciones por *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus* en comparación con los ensayos del estado de la técnica.

5 El problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante la materia sujeto de las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.

En un primer aspecto, el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante un transportador útil en diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra de un sujeto.

10 El transportador comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende p7 y p16/18 y opcionalmente p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, preferentemente todos ellos.

15 En otra realización preferida del primer aspecto, el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* es el respectivo polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* o una variante del mismo, preferentemente en una forma natural del polipéptido.

20 En otra realización preferida del primer aspecto, el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* se proporciona en forma de un extracto polipeptídico procedente de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis*, más preferentemente separado por pesos moleculares, y, y en el que el extracto polipeptídico comprende p16/18 y p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* que se han separado lo suficiente para permitir la distinción entre un anticuerpo contra p16/18 de otro anticuerpo contra p21. En particular, la distancia entre p16/18 y p21 sobre el transportador es tal que las bandas asociadas con el mismo no se solapan de forma que una señal que indique la unión e un anticuerpo contra p16/18 no se pueda distinguir de una señal que indique la unión de un anticuerpo contra p21. En otras palabras, el transportador se puede usar para detectar si los anticuerpos contra p16/18, contra p21, o los anticuerpos contra ambos p16/18 y p21 están presentes en la muestra.

25 El transportador comprende además un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, preferentemente todos ellos.

30 En otra realización preferida del primer aspecto, el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* es el respectivo polipéptido del grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* o una variante de los mismos, proporcionados preferentemente en la forma de uno o más polipéptidos recombinantes y/o purificados.

35 En un segundo aspecto, el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante un kit que comprende el transportador útil en diagnóstico de acuerdo con la presente invención, que preferentemente comprende además un medio para detectar cualquier anticuerpo capturado.

En un tercer aspecto, el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante un procedimiento que comprende la etapa de detectar un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra de un sujeto.

40 El procedimiento también comprende detectar un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende p7 y p16/18 y opcionalmente p25/26, preferentemente todos ellos, más preferentemente p7 y p16/p18, lo más preferible p7.

45 El procedimiento también comprende la etapa de detectar un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, preferentemente todos ellos.

50 En otra realización preferida del tercer aspecto, los anticuerpos contra más de uno de los polipéptidos de dicho grupo se detectan simultáneamente.

55 En otra realización preferida del tercer aspecto, los anticuerpos contra más de uno de los polipéptidos de dicho grupo se detectan en reacciones de unión espacialmente separadas, o en una reacción en un único recipiente, preferentemente en una reacción en un único recipiente.

En otra realización preferida del tercer aspecto, en la que un anticuerpo contra p21 detectado se puede distinguir de un anticuerpo que se une a p16/18.

También se desvela el uso de p21 procedente de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis* o una variante del mismo para aumentar la fiabilidad del diagnóstico, preferentemente, la sensibilidad de un ensayo para la detección de una infección por *Echinococcus*, más preferentemente para distinguir una infección por *Echinococcus multilocularis* de una infección por *Echinococcus granulosus*.

Se desvela en el presente documento un polipéptido que tiene un peso molecular de 21 kDa procedente de *Echinococcus multilocularis* o una variante del mismo, que se puede obtener mediante la separación por pesos moleculares de un extracto procedente de *Echinococcus multilocularis* usando electroforesis en gel, o un anticuerpo contra dicho polipéptido.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los inventores de que un novedoso polipéptido de *Echinococcus*, denominado en toda esta solicitud como "p21", existe y que, cuando se incorpora a los ensayos para detectar una infección por *Echinococcus*, puede potenciar la sensibilidad global del ensayo.

La presente invención se centra alrededor de un ensayo para diagnosticar una infección por *Echinococcus* que implica detectar, en una muestra de un sujeto con sospecha de tener una infección por *Echinococcus*, anticuerpos contra el polipéptido p21 procedente de *Echinococcus multilocularis*. p21 es un polipéptido que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 21 kDa según se analiza mediante SDS PAGE en condiciones reductoras, y su comparación con el comportamiento de análisis de las proteínas marcadoras de peso molecular patrón analizadas en las mismas condiciones. Las bandas del polipéptido p21 transcurre entre las bandas de los polipéptidos p16/p18 y p25/26 descritos en el estado de la técnica. La detección de los anticuerpos contra p21, y preferentemente contra uno o más polipéptidos del grupo que comprende p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus* y Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* puede corroborar la suposición de que el paciente padece una infección por *Echinococcus* y proporcionar información relevante para el diagnóstico. Preferentemente, el transportador útil en diagnóstico comprende p16/18 y p21 procedentes de *Echinococcus multilocularis* o una variante de los mismos, que se han separado lo suficiente para permitir la distinción entre un anticuerpo contra p16/18 de otro anticuerpo contra p21. Más preferentemente, puede comprender la adición, en orden de preferencia creciente, p7; p7 y Em18 procedentes de *Echinococcus multilocularis*; p7, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis*; o p7, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* y AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus* o variantes de los mismos. Preferentemente, cualquier polipéptido derivado del grupo que comprende p7, p16/18 y p21 es un polipéptido natural, mientras que cualquier polipéptido derivado del grupo que comprende Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* y AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus* es recombinante. Dicho transportador se puede usar para detectar una infección por *Echinococcus* con mayor sensibilidad.

La proteína natural se puede obtener preparando un extracto polipeptídico procedente de *Echinococcus multilocularis* preferentemente según el protocolo de Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., y Brehm, K. (2004) Long-termin *in vitro* cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions *Parasitol. Res.* 92 (5), 430-432. p21 se puede detectar, en la totalidad del procedimiento de purificación, mediante inmunotransferencia, usando una muestra de un paciente infectado que reacciona con p21 como fuente de anticuerpos. Preferentemente, p21 se enriquece con respecto a su proporción en otros polipéptidos del tejido natural, por ejemplo, separando el extracto polipeptídico por tamaños, recogiendo las fracciones, y preparando una mezcla que comprende un volumen de las fracciones que contienen p21 que supere el volumen de otras fracciones. Preferentemente, el p21 usado de acuerdo con la invención es un p21 no recombinante purificado a partir de un tejido.

La banda de la proteína que comprende p21 se puede recortar del gel tras finalizar la electroforesis, y eluirse la proteína usando técnicas convencionales para purificación de proteínas. Se puede separar de cualquier polipéptido que se analice con un peso molecular similar mediante cromatografía de afinidad, usando una muestra de un paciente infectado reactivo con p21 para obtener el anticuerpo contra p21 como ligando de afinidad. La persona experta en la técnica está familiarizada con dichos procedimientos.

Como alternativa, un trozo del gel de electroforesis que comprende los polipéptidos procedentes de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis* que tienen una proporción enriquecida de polipéptidos, entre ellos de p21, que tienen determinado intervalo de pesos moleculares, según se considera mediante marcadores de peso molecular patrón, en comparación con un extracto polipeptídico no procesado, se puede recortar de un gel de electroforesis obtenido sometiendo un extracto polipeptídico procedente de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis*, a electroforesis en gel preparativa. Preferentemente, el intervalo de pesos moleculares del gel incluye polipéptidos de 1 a 200 kDa, más preferentemente de 5 a 100 kDa, más preferentemente de 6 a 50 kDa y más preferentemente de 7 a 30 kDa, en el que, lo más preferible, los polipéptidos naturales procedentes de *Echinococcus*, preferentemente de *Echinococcus multilocularis*, no comprendidos en dicho intervalo de pesos moleculares está presentes en menor proporción en que el extracto polipeptídico obtenido directamente del

organismo. Los polipéptidos no comprendidos en dicho intervalo de pesos moleculares pueden estar opcionalmente ausentes, por ejemplo, como resultado de recortar el trozo de gel que comprende el intervalo de pesos moleculares deseados, y de descartar el resto del gel. Están disponibles otras opciones para producir una fracción de polipéptidos procedentes de *Echinococcus*, preferentemente de *Echinococcus multilocularis*, enriquecida en dichos polipéptidos, en comparación con un extracto polipeptídico no procesado, comprendido en dicho intervalo de pesos moleculares, por ejemplo, el uso de la cromatografía de exclusión molecular.

Es ventajoso que cualquier separación por pesos moleculares sea suficiente para permitir la distinción entre p21 y cualquier otro polipéptido que tenga un peso molecular similar, por ejemplo p18 y p25/p26. La persona experta en la técnica está familiarizada con las técnicas adecuadas, por ejemplo, electroforesis en gel usando geles con una concentración de poli(acrilamida) específicamente adaptada para la separación eficaz de polipéptidos que tienen un determinado peso molecular, por ejemplo 21 kDa. La cantidad de p21, para cualquier aspecto de la presente invención, debe ser suficiente para que la detección se pueda separar de cualquier señal del fondo, por ejemplo, para su detección usando un anticuerpo secundario marcado, en el que, preferentemente, la marca tiene actividad enzimática o es quimioluminiscente, fluorescente o radiactiva.

Los polipéptidos de *Echinococcus multilocularis* que tienen dicho intervalo de pesos moleculares, opcionalmente, asociados con dicho trozo de gel de electroforesis, se pueden transferir, por ejemplo, mediante electrotransferencia, a un transportador útil para el diagnóstico, preferentemente un transportador sólido, opcionalmente en forma de una tira reactiva, preferentemente una línea de transferencia. El transportador sólido puede comprender uno o más polipéptidos recombinantes y/o purificados relevantes para el diagnóstico procedentes de *Echinococcus multilocularis* además. En una realización preferida, la expresión polipéptido "purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que constituye al menos un 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99 % de todos los polipéptidos presentes, según se considera mediante SDS PAGE seguido de tinción de Coomassie y exploración visual.

La invención se refiere a un transportador útil para el diagnóstico, que es preferentemente un transportador sólido para poner en contacto un medio para capturar específicamente un anticuerpo, lo que significa que está asociado con dicho transportador, con una muestra de fluido corporal procedente de un sujeto, preferentemente un sujeto humano. En una realización preferida, el transportador sólido es un dispositivo diagnóstico, más preferentemente seleccionado del grupo que comprende una o más perlas, una tira reactiva, una placa de microtitulación, una transferencia, una superficie de vidrio, un biochip y una membrana, más preferentemente del grupo que comprende una transferencia, una tira reactiva y una membrana. En una realización más preferida, el transportador útil para el diagnóstico es una línea de transferencia (Raoult, D., y Dasch, G. a. (1989), The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria. J. Immunol. Methods, 125 (1-2), 57-65; WO2013041540). En una realización preferida, la expresión "línea de transferencia", como se usa en el presente documento, se refiere a una tira reactiva, más preferentemente de tipo membrana, que se ha revestido con uno o más medios para capturar un anticuerpo, preferentemente un polipéptido cada uno. Si se utilizan dos o más medios, están preferentemente separados entre sí en el transportador, preferentemente a lo largo del eje longitudinal de un transportador en forma de una tira reactiva. Preferentemente, la anchura de la banda es al menos un 30, más preferentemente un 40, 50, 60, 70 u 80 % de la anchura de la tira reactiva. La tira reactiva puede comprender una o más bandas de control para confirmar que se ha puesto en contacto el tiempo suficiente con la muestra y en condiciones adecuadas, en particular en presencia de un suero humano, conjugado de anticuerpos, o ambos. Están comercialmente disponibles muchas soluciones para diagnóstico que incluyen transferencias en línea, por ejemplo, de EUROIMMUN, Lübeck, Alemania.

Es fundamental que la muestra utilizada para llevar a la práctica en la presente invención comprenda anticuerpos, también denominados como inmunoglobulinas. Típicamente, la muestra es un fluido corporal que comprende un conjunto representativo de los anticuerpos del sujeto. La muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en sangre completa, suero, líquido cefalorraquídeo y saliva, y es preferentemente suero o plasma, más preferentemente suero. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos.

Es fundamental que el transportador útil para el diagnóstico comprenda un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos antigénicos de relevancia diagnóstica procedentes de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis*. El transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la invención sirve como estructura base para el uno o más de estos medios, que son moléculas que capturan específicamente el anticuerpo de interés. El experto en la técnica es conocedor de la miríada de procedimientos para fabricar e identificar moléculas con las propiedades de unión deseadas o para adaptar una molécula existente. Estas moléculas incluyen, aunque no de forma limitativa, butorfanol, aptámeros, moléculas pequeñas, y derivados de los mismos, y son preferentemente polipéptidos antigénicos. Dicho transportador es adecuado para transportar un procedimiento de diagnóstico.

Un primer grupo de polipéptidos antigénicos de relevancia diagnóstica incluye, además de p21, los polipéptidos del grupo que comprende p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis*. Estos son polipéptidos antigénicos conocidos, preferentemente no recombinantes, denominados según su peso molecular (Asian, M., Yüksel, P., Polat, E., Cakan, H., Ergin, S., öner, Y. a., Zengin, K., Arikan, S., Saribas, a., Mamal Torum, M., Kocazeybek, B. (2011) The diagnostic value of Western blot method in patients with cystic echinococcosis, New.

Microbiol. 23, 173-177). Un segundo grupo de polipéptidos antigénicos de relevancia diagnóstica incluye los del grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, en el que los términos "AgB8/1a", "AgB8/1b", "AgB8/2", "AgB8/3", "AgB8/4a" y "AgB8/4b" procedentes de *Echinococcus granulosus*, "Em18" y "Em95" procedentes de *Echinococcus multilocularis*, se refieren a las secuencias presentadas por los códigos de bases de datos SEQ ID NO1 (Eg AgB8/1a), SEQ ID NO 2 (EG AgB8/1b), SEQ ID NO 3 (Eg AgB8/2), SEQ ID NO 4 (Eg AgB8/3), SEQ ID NO 5 (Eg AgB8/4a), SEQ ID NO 6 (Eg_AgB8/4b), SEQ ID NO 7 (*Echinococcus multilocularis* Em18) y SEQ ID No 8 (*Echinococcus multilocularis* Em95), respectivamente. Opcionalmente, uno o más de estos polipéptidos o variante de los mismos, por ejemplo, los del grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, se pueden fusionar para generar una proteína de fusión tal como la SEQ ID NO 9. Cualesquiera códigos de bases de datos a los que se haga referencia a lo largo de la presente solicitud se refieren a la correspondiente secuencia polipeptídica disponible mediante las bases de datos del NCBI publicadas en línea en la fecha de prioridad de la presente solicitud.

De acuerdo con la presente invención, el transportador comprende uno o más medios para capturar específicamente un anticuerpo, preferentemente uno o más, más preferentemente dos o más, más preferentemente tres o más, más preferentemente cuatro o más de dichos medios, capaz cada uno de ellos para capturar específicamente un anticuerpo diferente, como se define en las presentes reivindicaciones. Dicho medio está preferentemente inmovilizado sobre dicho transportador. En una realización preferida, el medio para capturar específicamente un anticuerpo de interés es un polipéptido antigénico que comprende o consiste del polipéptido antigénico al que se une el anticuerpo, preferentemente del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus* y Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis*. Dicho polipéptido antigénico contiene uno o más epítopos característicos que comprenden al menos 7, preferentemente 10, más preferentemente 15 aminoácidos, que transmiten la capacidad de unirse específicamente al anticuerpo en una muestra procedente de un paciente infectado. Dicho polipéptido antigénico, junto con el transportador insoluble al que está unido, se puede separar de una mezcla de reacción que comprende una muestra a analizar de una forma directa, por ejemplo, mediante filtración, centrifugación o decantación. Uno o más de estos polipéptidos antigénicos, por ejemplo p21 procedente de *Echinococcus multilocularis*, se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, o usarse en la fabricación de un agente para diagnosticar una enfermedad, dicha enfermedad es una infección por *Echinococcus*.

Dicho polipéptido antigénico se puede inmovilizar de una forma reversible o irreversible. Por ejemplo, la inmovilización es reversible si la molécula interactúa con el transportador mediante interacciones iónicas que se pueden enmascarar mediante la adición de una elevada concentración de sal o si la molécula está unida mediante un enlace covalente escindible. Por el contrario, la inmovilización es irreversible si la molécula está unida al transportador mediante un enlace covalente que no se puede escindir en solución acuosa. El polipéptido se puede inmovilizar indirectamente, por ejemplo, inmovilizando un anticuerpo u otra entidad que tenga afinidad por el polipéptido, seguido por la adición del polipéptido y la formación de un complejo polipéptidos-anticuerpo.

Sin embargo, las enseñanzas de la presente invención pueden no solo llevarse a cabo usando polipéptidos que tengan las secuencias exactas a las que se hace referencia explícitamente en la presente solicitud, por ejemplo, por la función, nombre, secuencia o número de referencia, o implícitamente, pero también usando variantes de dichos polipéptidos.

En una realización preferida, el término "variante", como se usa en el presente documento, se puede referir a al menos un fragmento de la secuencia de longitud completa que se cita, más específicamente, uno o más secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico que, con respecto a la secuencia de longitud completa, está truncada en uno o ambos extremos mediante uno o más aminoácidos. Dicho fragmento comprende o codifica un péptido que tiene al menos 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 o 200 aminoácidos sucesivos de la secuencia original, o una variante de la misma. La longitud total de la variante puede ser de 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos. En el caso de una proteína natural, dichos fragmentos se pueden preparar mediante proteólisis limitada. En el caso de una proteína recombinante, una posibilidad adicional es expresar polipéptidos truncados.

En otra realización preferida, el término "variante" se refiere no solamente a al menos un fragmento, sino también a un polipéptido o un fragmento del mismo que comprende secuencias de aminoácidos, preferentemente un fragmento que comprende al menos 25, más preferentemente 50, más preferentemente 200 aminoácidos sucesivos, que son al menos 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticos a la secuencia de aminoácidos de referencia que se cita o a un fragmento de la misma, en la que aminoácidos diferentes a los esenciales para la actividad biológica, por ejemplo, la capacidad para unirse a un anticuerpo de interés, o el pliegue o estructura del polipéptido se eliminan o sustituyen y/o uno o más de dichos aminoácidos esenciales se sustituyen de una forma conservativa y/o los aminoácidos se añaden o se eliminan de forma que la actividad biológica del polipéptido de conserva al menos en parte. El estado de la técnica comprende varios procedimientos que se pueden usar para alinear dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos dadas y calcular el grado de identidad, véanse por ejemplo, Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, Oxford University Press, 2008, 3ª edición. En una realización preferida, el programa informático ClustalW (Larkin, M. a., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. a., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, a., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J.,

Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948) se utiliza aplicando la configuración por defecto.

En una realización preferida, las variantes pueden comprender, además, modificaciones químicas, por ejemplo marcas isotópicas o modificaciones covalentes tales como glicosilación, fosforilación, acetilación, descarboxilación, citrulinación, hidroxilación y similares. Esto puede incluir la ligadura química no recombinante de una proteína natural o recombinante con una proteína natural, recombinante o químicamente sintetizada. El experto en la técnica está familiarizado con los procedimientos para la modificación de polipéptidos. Además, se pueden generar también variantes mediante fusión con otros polipéptidos conocidos o las variantes de los mismos.

La variante del polipéptido tiene actividad biológica. En una realización preferida, dicha actividad biológica es la capacidad de capturar un anticuerpo con el polipéptido respectivo a partir de una muestra obtenida de un sujeto infectado por *Echinococcus* que comprende dicho anticuerpo, pero no de una muestra obtenida de un sujeto sano.

Cualquier polipéptido utilizado para llevar a cabo las enseñanzas inventivas, incluyendo cualquier variante, se diseña de forma que sea antigénico, es decir, comprende epítomos reconocidos específicamente por anticuerpos de pacientes que padecen una infección por *Echinococcus* (pero no anticuerpos de sujetos sanos), más preferentemente de una infección por *E. granulosus* o *E. multilocularis*. En una realización, dicho polipéptido comprende un tramo de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más, preferentemente al menos 9, pero no más de 16, aminoácidos consecutivos del respectivo polipéptido de *Echinococcus* natural. El experto en la técnica está familiarizado con las directrices usadas para diseñar péptidos que tienen inmunogenicidad suficiente, por ejemplo, las descritas en Jackson, D. C., Fitzmaurice, C. J., Brown, L. E., Zeng, W. (1999), Preparation and properties of totally synthetic immunogenes, Vaccine Volumen 18, Fascículos 3-4, septiembre de 1999, páginas 355-361; y Black, M., Trent, A., Tirrell, M. y Olive, C. (2010), Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists, Expert Rev Vaccines, febrero de 2010; 9(2): 157-173. En resumen, es deseable que el péptido cumpla tanto como sea posible los siguientes requerimientos: (a) tenga un alto grado de hidrofiliidad, (b) comprenda uno o más restos seleccionado entre el grupo que comprende aspartato, prolina, tirosina y fenilalanina, (c) tenga, para una mayor especificidad, ninguna o poca homología con otros péptidos o polipéptidos conocidos, (d) necesita ser suficientemente soluble y (e) no comprenda sitios de glicosilación o fosforilación salvo que se requiera por motivos específicos. Como alternativa, se pueden seguir estrategias bioinformáticas, por ejemplo, las descritas por Moreau, V., Fleury, C., Piquer, D., Nguyen, C., Novali, N., Villard, S., Laune, D., Granier, C. y Molina, F. (2008), PEPOP: Computational design of immunogenic peptides, BMC Bioinformatics 2008, 9:71.

Si se usa un polipéptido antigénico como el medio para capturar específicamente un anticuerpo, por ejemplo, p21, dicho polipéptido, cuando se usa para llevar a cabo las enseñanzas de la presente invención, puede proporcionarse en cualquier forma y en cualquier grado de purificación, a partir de tejidos o células que comprenden dicho polipéptido en una forma endógena, más preferentemente células que expresan en exceso el polipéptido, los lisados en bruto o enriquecidos de dichas células, a un polipéptido purificado y/o aislado que es esencialmente puro. En una realización preferida, el polipéptido es un polipéptido natural, en el que el término "polipéptido natural", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido plegado, más preferentemente a un polipéptido plegado purificado a partir de tejidos o células, más preferentemente de células o tejido de mamíferos, opcionalmente de tejidos o células no recombinantes. Si se usa un polipéptido natural, está preferentemente enriquecido en comparación con su estado natural. El anticuerpo capturado o detectado de acuerdo con la presente invención es preferentemente un anticuerpo de clase IgG.

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido puede ser una proteína recombinante, en el que el término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido producido utilizando estrategias de ingeniería genética en cualquier etapa del procedimiento de producción, por ejemplo, fusionando un ácido nucleico que codifica el polipéptido a un promotor fuerte para la expresión en exceso en células o tejidos o diseñando mediante ingeniería genética la secuencia del propio polipéptido. El experto en la técnica está familiarizado con los procedimientos para diseñar mediante ingeniería genética los ácidos nucleicos y los polipéptidos codificados (por ejemplo, descritos en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning, CSH o en Brown T. A. (1986), Gene Cloning - an introduction, Chapman & Hall) y para producir y purificar polipéptidos nativos o recombinantes (por ejemplo Handbooks "Strategies for Protein Purification", "Antibody Purification", publicado por GE Healthcare Life Sciences, y en Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (2009): Guide to Protein Purification). En otra realización preferida, el polipéptido es un polipéptido aislado, en el que el término "aislado" significa que el polipéptido se ha enriquecido en comparación con su estado tras la producción utilizando una estrategia biotecnológica o sintética y es preferentemente puro, es decir, al menos un 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento del polipéptido en la muestra respectiva consiste en dicho polipéptido según la electroforesis en gel de SDS poliacrilamida seguida por la tinción con azul de Coomassie y exploración visual.

El sujeto de acuerdo con la presente invención es un organismo productor de anticuerpos, preferentemente, anticuerpos relacionados con una infección, más preferentemente de un mamífero, lo más preferible un ser humano. Preferentemente, ninguno de los procedimientos de acuerdo con las presentes invenciones se practican en el cuerpo humano o animal, sino en condiciones *in vitro*.

Comprendido en el ámbito de la presente invención está un transportador útil para el diagnóstico que comprende medios para capturar específicamente un anticuerpo para un polipéptido antigénico tal como p21. En una realización preferida, la expresión "capturar específicamente un antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de unirse específicamente al anticuerpo de interés con el fin de que se una y elimine de la muestra en lugar de unirse a cualquier anticuerpo o a algún anticuerpo de una determinada clase de anticuerpos presente en la muestra.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un medio para detectar específicamente un anticuerpo capturado, opcionalmente como parte de un kit. En una realización preferida, la expresión "detectar específicamente un anticuerpo capturado", como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo se une específicamente al medio para capturar específicamente el anticuerpo, preferentemente p21, tras la captura, se detectó más bien que la totalidad de los anticuerpos presentes en la muestra debido a la capacidad del medio para unirse específicamente a la región variable del anticuerpo que determina la especificidad de unión del anticuerpo y no su región constante. En una realización preferida, la expresión "unión de forma específica", como se usa en el presente documento, significa que la unión es más fuerte que una reacción de unión caracterizada por una constante de disociación de 1×10^{-5} M, más preferentemente 1×10^{-7} M, más preferentemente 1×10^{-8} M, más preferentemente 1×10^{-9} M, más preferentemente 1×10^{-10} M, más preferentemente 1×10^{-11} M, más preferentemente 1×10^{-12} M, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un equipo Biacore a 25 °C en tampón PBS a pH 7.

En una realización preferida, el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un primer polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención y el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un segundo polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención está en transportadores independientes. Esto significa que el medio no está unido a un único transportador, sino a uno o más transportadores que están separados y/o son separables sin dañarlos. Por ejemplo, el medio para capturar específicamente un anticuerpo p21 puede estar unido a una primera tira reactiva y el medio para detectar un anticuerpo contra p16 está unido a otra tira reactiva que está separada de la primera tira reactiva.

En otra realización preferida, el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un primer polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención y el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un segundo polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención está en uno, preferentemente unidos covalentemente a un transportador. Esto significa que el medio está unido a un transportador que no puede desmontarse, sin dañar el transportador, de manera que los medios están en transportadores separados. Por ejemplo, la tira reactiva puede estar revestida con todos los medios, particularmente en la forma de una transferencia en línea.

Las enseñanzas de acuerdo con la presente invención proporcionan un kit, preferentemente para el diagnóstico de una infección por *Echinococcus*, más preferentemente para distinguir entre una infección por *E. granulosus* de una infección por *E. multilocularis*. Dicho kit es un recipiente que comprende los reactivos específicos requeridos para llevar a la práctica el procedimiento de acuerdo con la presente invención, en particular el transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención, opcionalmente, además de una o más soluciones requeridas para llevar a la práctica el procedimiento de acuerdo con la presente invención, seleccionadas preferentemente de o entre todo el grupo que comprende un tampón de dilución de muestra, tampón de lavado y tampón que comprende un medio para detectar cualquier anticuerpo específicamente capturado, tal como un anticuerpo secundario y opcionalmente un medio para detectar este último. Además, puede comprender instrucciones que detallan cómo usar el kit y el transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención para poner en contacto el polipéptido de acuerdo con la presente invención con una muestra de fluido corporal procedente de un sujeto, preferentemente un sujeto humano, por ejemplo una transferencia en línea, en el que el medio para capturar específicamente p21 de acuerdo con la presente invención, preferentemente un polipéptido que comprende p21 o una variante del mismo, se inmoviliza sobre la transferencia en línea. Además, el kit puede comprender un control positivo, por ejemplo, un anticuerpo conocido por unirse a p21, y un control negativo, por ejemplo, una proteína que no tiene afinidad detectable por p21 tal como albúmina de suero bovino. Finalmente, dicho kit puede comprender una solución patrón que comprende un anticuerpo de unión a p21 para preparar una curva de calibración. En una realización preferida, el kit comprende un dispositivo, preferentemente un dispositivo basado en una transferencia tal como una transferencia en línea revestida con un medio para capturar específicamente un polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la invención, se puede proporcionar un medio para detectar el uno o más anticuerpos capturados. El experto en la técnica conoce muchos procedimientos que se pueden usar. En una realización preferida, se usa la unión de un anticuerpo secundario a la región constante del uno o más anticuerpos capturados, que es el correspondiente anticuerpo primario, cuyo anticuerpo secundario puede estar asociado con una marca que es fácil de detectar, por ejemplo una marca fluorescente, radioactiva o enzimáticamente activa, la última de la cual puede catalizar una reacción quimioluminiscente o la generación de una molécula detectable usando colorimetría o espectroscopía u otro procedimiento analítico.

En una realización preferida, el término "diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de procedimiento destinado a obtener información instrumental para evaluar si un paciente padece o es

probable o más probable que un sujeto promedio o sujeto comparativo padezca (teniendo el último preferentemente síntomas similares) una determinada enfermedad o trastorno en el pasado, en el momento del diagnóstico o en el futuro, para descubrir cómo está progresando la enfermedad o cómo progresará probablemente en el futuro o para evaluar la sensibilidad de un paciente con respecto a un determinado tratamiento, por ejemplo, la administración de fármacos adecuados. En otras palabras, el término "diagnóstico" comprende no solo ayudar al diagnóstico, sino también un pronóstico y/o los esfuerzos por vigilar el curso de una enfermedad o trastorno.

Por lo tanto, el término "diagnóstico" no implica preferentemente que los procedimientos de diagnóstico o los agentes de acuerdo con la presente invención sean definitivos y suficientes para finalizar el diagnóstico sobre la base de un único ensayo, y mucho menos un único parámetro. Por el contrario, se debe enfatizar que se debe recopilar una gran cantidad de información adicional, en particular, mediante técnicas de formación de imágenes (barrido ultrasónico y tomografía computarizada, y debe ponderarse cuidadosamente por un doctor en medicina para obtener para obtener una imagen coherente que permita a dicho doctor proporcionar un diagnóstico final.

El término "diagnóstico" puede referirse a una contribución a lo que se denomina "diagnóstico diferencial", es decir, un procedimiento de diagnóstico sistemático que considera la probabilidad de una gama de posibles dolencias sobre la base de una gama de parámetros diagnósticos. El término "diagnóstico" puede referirse también a un procedimiento o agente utilizado para escoger el régimen de tratamiento más prometedor para un paciente. En otras palabras, el procedimiento o agente puede referirse a la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto.

La presente invención se refiere a un procedimiento que comprende la etapa de detectar en una muestra procedente de un sujeto un anticuerpo contra un polipéptido antigénico tal como p21. Dicho procedimiento puede comprender las etapas de a) proporcionar una muestra procedente de un sujeto, b) poner en contacto la muestra con el transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención en condiciones compatibles con la formación de un complejo que comprende el transportador útil para el diagnóstico y el anticuerpo, más específicamente el medio para capturar específicamente el anticuerpo unido al antígeno, c) aislar cualquiera de dichos complejos, por ejemplo, retirando la muestra, d) lavar opcionalmente dicho complejo, y e) detectar dicho complejo. El procedimiento es preferentemente un procedimiento *in vitro*. La detección de un anticuerpo, más específicamente dicho complejo de acuerdo con la presente invención comprende el uso de un procedimiento seleccionado entre el grupo que comprende técnicas de inmunodifusión, técnicas inmunoelectroforéticas, inmunoensayos mediante dispersión de luz, inmunoensayos mediante dispersión de luz, técnicas de aglutinación, inmunoensayos marcados tales como los del grupo que comprende un inmunoensayo radiomarcado, enzimoanálisis tales como análisis colorimétricos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y técnicas de inmunofluorescencia. El experto en la técnica está familiarizado con dichos procedimientos, que se describen también en el estado de la técnica, por ejemplo en Zane, H. D. (2001): Immunology - Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine, W. B. Saunders Company, en particular en el Capítulo 14.

En muchos casos, detectar un anticuerpo, significa opcionalmente determinar si la concentración del anticuerpo en la muestra está más allá de un determinado umbral suficiente para el diagnóstico. Si se puede detectar el anticuerpo, este resultado será instrumental para el diagnóstico del médico e indica una mayor probabilidad de que el paciente padezca la enfermedad. En una realización preferida, se puede determinar la concentración relativa del anticuerpo en el suero, en comparación con el nivel que se puede encontrar en el sujeto sano promedio. En una realización preferida, El término "detectar", como se usa en el presente documento, significa que es suficiente comprobar si se puede detectar una suficientemente más allá de cualquier nivel de fondo utilizando un procedimiento de detección del complejo adecuado que indica que el anticuerpo de interés está presente o están presentes más anticuerpos de interés que lo que estarían en un sujeto sano. En una realización más preferida, esto puede implicar determinar si la concentración es al menos 0,1, preferentemente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 10000 o 100000 veces mayor que la concentración del anticuerpo de interés que se encuentra en el sujeto sano promedio.

En una realización preferida, al menos dos anticuerpos, cada uno de ellos contra un polipéptido antigénico diferente de acuerdo con la presente invención, se detectan simultáneamente, es decir a la vez. Esto es conveniente en términos de procedimientos diagnósticos eficaces, ya que se obtiene una máxima información de diagnóstico en un periodo de tiempo dado. Por supuesto, un requisito previo es que esté disponible la capacidad suficiente para realizar todas las reacciones.

En una realización preferida, al menos dos anticuerpos, cada uno de ellos contra un polipéptido antigénico de acuerdo con la presente invención, se detectan en reacciones espacialmente separadas. Esto significa que estas reacciones se realizan en diferentes mezclas de reacción en recipientes separados.

Si se va a detectar más de un anticuerpo, el procedimiento se puede llevar a cabo como reacción en un único recipiente. Preferentemente, la expresión "reacción en un único recipiente", como se usa en el presente documento, significa que dos o más, preferentemente todas las reacciones realizadas con el fin de detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo se llevan a cabo en la misma mezcla de reacción en un recipiente de reacción, sin barreras físicas entre las reacciones, a diferencia de los escenarios experimentales, que contemplan que al menos dos reacciones se llevan a cabo en soluciones y recipientes de reacción independientes. El modo de un único recipiente es ventajoso, ya que solo se debe configurar una reacción, ahorrando de esta forma tiempo y recursos. Se puede reducir el volumen mínimo de muestra necesario.

La presente invención se ilustra adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos no limitativos de los que se pueden extraer características, realizaciones, aspectos y ventajas adicionales de la presente invención.

La **Fig. 1** muestra un transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Se trata de una transferencia en línea que comprende una sección revestida con polipéptidos del extracto polipeptídico de *E. multilocularis* en el intervalo de pesos moleculares de 7 a 160 kDa, separado por pesos moleculares anteriormente mediante electroforesis seguido de transferencia sobre la línea de transferencia mediante electrotransferencia.

Además, comprende una proteínas de fusión recombinante AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus* y Em18 y Em95 recombinantes procedentes de *Echinococcus multilocularis*.

La **Fig. 2** muestra un intervalo de transferencias en línea producidas de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Cada una se ha puesto en contacto con una muestra de un paciente diferente. La comparación entre las diferentes transferencias reveladas muestra que p21 es un polipéptido antigénico diferente de los polipéptidos antigénicos anteriormente usados tales como p18.

La **Fig. 3** muestra la parte de las transferencias en línea que comprenden las proteínas de *Echinococcus* naturales separadas por pesos moleculares.

Numerosas secuencias polipeptídicas se citan en toda esta solicitud. Estas incluyen:

SEQ ID NO	Polipéptido (E.g. = <i>E. granulosus</i> ; E. m. = <i>E. multilocularis</i>)
SEQ ID NO 1	Eg AgB8/1a
SEQ ID NO 2	Eg AgB8/1b
SEQ ID NO 3	Eg AgB8/2
SEQ ID NO 4	Eg AgB8/3
SEQ ID NO 5	Eg AgB8/4a
SEQ ID NO 6	Eg AgB8/4b
SEQ ID NO 7	Em18
SEQ ID NO 8	Em95
SEQ ID NO 9	Fusión que comprende Eg AgB8/1a, Eg AgB8/1b, Eg AgB8/2, Eg AgB8/3, Eg AgB8/4a, Eg AgB8/4b
SEQ ID NO 10	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/1a
SEQ ID NO 11	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/1b
SEQ ID NO 12	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/2
SEQ ID NO 13	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/3
SEQ ID NO 14	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/4a
SEQ ID NO 15	Fusión His-GST que comprende Eg AgB8/4b
SEQ ID NO 16	Fusión His que comprende Em18
SEQ ID NO 17	Fusión His que comprende Em95

Ejemplo 1: Producción del transportador útil para el diagnóstico

La transferencia en línea representado gráficamente en la Fig. 1 se usó para el programa experimental descrito en el presente documento. Se preparó separando electroforéticamente por pesos moleculares polipéptidos procedentes de un extracto polipeptídico de *E. multilocularis* que comprende las proteínas p7, p16/18, p21 y p25/26 en el intervalo de pesos moleculares de 7 a 160 kDa, preparado como se ha descrito en Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., y Brehm, K. (2004) Long-termin *in vitro* cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions Parasitol. Res. 92 (5), 430-432., con modificaciones poco importantes, y transferir los polipéptidos separados resultantes sobre una membrana, en el que el patrón de polipéptidos que se ha separado permanece intacto. Además, la membrana se revisó usando una proteína de fusión recombinante que comprende AgB8/1a,

AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b (SEQ ID NO 9) y los polipéptidos recombinantes Em18 (SEQ ID NO 16) y Em95 (SEQ ID NO 17). Todas las proteínas recombinantes se purificaron usando protocolos convencionales para el aislamiento de GST y/o proteína marcada con His.

Ejemplo 2: Evaluación de la fiabilidad en el diagnóstico

5 Para determinar la sensibilidad, especificidad, índice de diferenciación entre especies y reactividad cruzada con la infección producida por otros parásitos, se realizó un estudio usando 50 sueros obtenidos de donantes de sangre sanos, 50 sueros obtenidos de pacientes con tumores, 52 sueros obtenidos de pacientes infectados por *E. multilocularis*, 55 sueros obtenidos de pacientes infectados por *E. granulosus*, 122 sueros obtenidos de pacientes infectados por otros parásitos (n=5 *Filaria*, n=10 *Toxocara*, n=16 *Anisakis*, n=10 *Strongyloides*, n=9 *Schistosoma*, n=2 *Multihelminthos*, n=7 *Plasmodium*, n=10 *Ascaris*, n=7 *Taenia*, n=13 *Trichinella*, n=17 *Fasciola*, n=11 *Entamoeba*, n=5 *Leishmania*). Los pacientes se examinaron detenidamente por un médico especialista para establecer el correspondiente diagnóstico. Este incluyó exploraciones diagnósticas basadas en serología, sonografía y tomografía computerizada.

15 La transferencia producida como se describe en el Ejemplo 1 se puso en contacto posteriormente con el suero del paciente y se reveló usando los reactivos y las instrucciones proporcionadas con el *Anti-Echinococcus granulosus* Westernblot comercial (DY2320-G, EUROIMMUN, Lübeck).

Si se pueden detectar anticuerpos contra al menos uno de los antígenos del grupo que comprende Em18, Em95, la proteína de fusión AgB, p7, p16/18 y p21, se concluyó que el correspondiente paciente padece una infección por *Echinococcus*.

20 Se tomaron anticuerpos contra Em18 y/o Em95 para indicar una infección por *Echinococcus multilocularis*, mientras que los anticuerpos contra la proteína de fusión AgB en ausencia de anticuerpos contra Em18 y/o Em95 se tomó para indicar una infección por *Echinococcus granulosus*.

Resultados:

25 El estudio reveló una sensibilidad del 93 %, una especificidad del 100 %, un índice de diferenciación entre especies del 81 %, y una reactividad cruzada del 6 %.

En algunos casos, ilustrados por la muestra analizada en el canal inferior representado gráficamente en la Fig. 3, se pudo detectar una infección por *Echinococcus* sobre la base de los anticuerpos contra p21, mientras que no se pudieron detectar anticuerpos contra p7 o p16/18.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> EUROIMMUN
- <120> Un ensayo novedoso para el diagnóstico de infecciones helmínticas
- <130> p00056
- <160> 17
- <170> BiSSAP 1.3
- 35 <210> 1
- <211> 66
- <212> PRT
- <213> *Echinococcus granulosus*
- 40 <220>
- <223> Eg AgB8/1a
- <400> 1

ES 2 714 513 T3

<210> 4
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Echinococcus granulosus

5 <220>
 <223> Eg AgB8/3

<400> 4

```

Met Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Val Thr Lys Thr Lys Lys Gly Val
1           5           10           15
Met Lys Ala Ile Ser Glu Ile Lys His Phe Phe Gln Ser Asp Pro Leu
           20           25           30
Gly Lys Lys Leu Val Glu Val Met Lys Asp Val Ala Ser Val Cys Glu
           35           40           45
Met Val Arg Lys Lys Ala Arg Met Ala Leu Lys Glu Tyr Val Arg Lys
           50           55           60
Leu Val Lys Glu Asp Glu
           65           70
  
```

10 <210> 5
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Echinococcus granulosus

<220>
 <223> Eg AgB8/4a

15 <400> 5

```

Met Lys Ala Glu Pro Glu Arg Cys Lys Cys Leu Ile Met Arg Lys Leu
1           5           10           15
Gly Glu Ile Arg Asp Phe Phe Arg Ser Asp Pro Leu Gly Gln Lys Leu
           20           25           30
Ala Ala Leu Gly Arg Asp Leu Thr Ala Ile Cys Gln Lys Leu Gln Leu
           35           40           45
Lys Val His Glu Val Leu Lys Lys Tyr Val Lys Asp Leu Leu Glu Glu
           50           55           60
Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys
           65           70
  
```

20 <210> 6
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Echinococcus granulosus

<220>
 <223> Eg_AgB8/4b

<400> 6

ES 2 714 513 T3

<220>
<223> Em95

<400> 8

Gln Glu Tyr Arg Gly Arg Gly Ile Glu Ile Lys Thr Thr Glu Ser Pro
 1 5 10 15
 Leu Arg Lys His Phe Ser Leu Thr Leu Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg
 20 25 30
 Leu Ser Trp Asp Val Gln His Leu Pro Asp Leu Arg Gly Thr Asn Ile
 35 40 45
 Ser Leu Lys Ala Leu Asp Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln
 50 55 60
 Thr Ala Gln Phe Ser Asp Gly Gln Leu Ala Ile Gly Arg Leu Lys Pro
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Tyr Gln Met Thr Val Glu Ala Val Arg Gly Lys Asn Thr
 85 90 95
 Thr Leu Lys Phe Thr Glu Asp Ile Lys Thr Leu Arg Ile Gly Glu Lys
 100 105 110
 Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala Leu Thr Ser Ala Ile Ala
 115 120 125
 Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Ile Val Leu Thr
 130 135 140

5 <210> 9
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> AgB8x
 <400> 9

ES 2 714 513 T3

Ser His His His His His His His His Ser Met Asp Asp Gly Leu Thr
1 5 10 15
Ser Thr Ser Arg Ser Val Met Lys Met Phe Gly Glu Val Lys Tyr Phe
20 25 30
Phe Glu Arg Asp Pro Leu Gly Gln Lys Val Val Asp Leu Leu Lys Glu
35 40 45
Leu Glu Glu Val Phe Gln Leu Leu Arg Lys Lys Leu Arg Met Ala Leu
50 55 60
Arg Ser His Leu Arg Gly Leu Ile Ala Glu Gly Glu Asp Asp Gly Leu
65 70 75 80
Thr Ser Thr Ser Arg Ser Val Met Lys Met Ile Gly Glu Arg Lys Tyr
85 90 95
Phe Phe Glu Arg Asp Pro Leu Gly Gln Lys Val Val Asp Leu Leu Lys
100 105 110
Glu Leu Glu Glu Val Phe Gln Leu Leu Arg Lys Lys Leu Arg Thr Ala
115 120 125
Leu Lys Ser His Leu Arg Glu Leu Val Ala Glu Gly Lys Lys Asp Glu
130 135 140
Pro Lys Ala His Met Gly Gln Val Val Lys Lys Arg Trp Gly Glu Leu
145 150 155 160
Arg Asp Phe Phe Arg Asn Asp Pro Leu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu
165 170 175
Gly Asn Asp Leu Thr Ala Ile Cys Gln Lys Leu Gln Leu Lys Ile Arg
180 185 190
Glu Val Leu Lys Lys Tyr Val Lys Asn Leu Val Glu Glu Lys Asp Asp
195 200 205
Asp Ser Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Val Thr Lys Thr Lys Lys
210 215 220
Gly Val Met Lys Ala Ile Ser Glu Ile Lys His Phe Phe Gln Ser Asp
225 230 235 240
Pro Leu Gly Lys Lys Leu Val Glu Val Met Lys Asp Val Ala Ser Val
245 250 255
Cys Glu Met Val Arg Lys Lys Ala Arg Met Ala Leu Lys Glu Tyr Val
260 265 270
Arg Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Lys Ala Glu Pro Glu Arg Cys Lys
275 280 285
Cys Leu Ile Met Arg Lys Leu Gly Glu Ile Arg Asp Phe Phe Arg Ser
290 295 300
Asp Pro Leu Gly Gln Lys Leu Ala Ala Leu Gly Arg Asp Leu Thr Ala
305 310 315 320
Ile Cys Gln Lys Leu Gln Leu Lys Val His Glu Val Leu Lys Lys Tyr
325 330 335
Val Lys Asp Leu Leu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Ala
340 345 350
Glu Pro Glu Arg Cys Lys Cys Leu Ile Thr Arg Lys Leu Ser Glu Val
355 360 365

ES 2 714 513 T3

```

Arg Asp Phe Phe Arg Ser Asp Pro Leu Gly Gln Arg Leu Val Ala Leu
 370                               375                               380
Gly Arg Asp Leu Thr Ala Ile Cys Gln Lys Leu His Leu Lys Ile His
385                               390                               395                               400
Glu Val Leu Lys Lys Tyr Val Lys Asp Leu Leu Glu Glu Glu Glu Glu
                               405                               410                               415
Glu Asp Asp Ser Lys Leu Glu
                               420

```

<210> 10

<211> 302

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/1a

<400> 10

```

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

Tyr Phe Phe Glu Arg Asp Pro Leu Gly Gln Lys Val Val Asp Leu Leu
                               260                              265                              270
Lys Glu Leu Glu Glu Val Phe Gln Leu Leu Arg Lys Lys Leu Arg Met
                               275                              280                              285
Ala Leu Arg Ser His Leu Arg Gly Leu Ile Ala Glu Gly Glu
 290                              295                              300

```

ES 2 714 513 T3

<210> 11
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/1b
 <400> 11

```

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

Lys Glu Leu Glu Glu Val Phe Gln Leu Leu Arg Lys Lys Leu Arg Thr
          275         280         285
Ala Leu Lys Ser His Leu Arg Glu Leu Val Ala Glu Gly Lys
          290         295         300
  
```

10 <210> 12
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/2

ES 2 714 513 T3

<400> 12

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

Glu Val Leu Lys Lys Tyr Val Lys Asn Leu Val Glu Glu Lys Asp Asp
290 295 300
Asp Ser Lys
305

<210> 13

<211> 306

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

ES 2 714 513 T3

<220>

<223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/3

<400> 13

```

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

Lys Ala Arg Met Ala Leu Lys Glu Tyr Val Arg Lys Leu Val Lys Glu
          290          295          300
Asp Glu
305

```

5

<210> 14

<211> 307

<212> PRT

ES 2 714 513 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/4a

<400> 14

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

5

<210> 15

ES 2 714 513 T3

<211> 308
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> His-GST-(PSc)-Eg_AgB8/4b

<400> 15

```

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

  Val Leu Lys Lys Tyr Val Lys Asp Leu Leu Glu Glu Glu Glu Glu
          290          295          300
  Asp Asp Ser Lys
  305
  
```

ES 2 714 513 T3

<210> 16
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Em18-His

<400> 16

Glu Gln Lys Leu Arg Glu Leu Arg Ala Gln Met Val Glu Lys Glu Ser
 1 5 10 15
 Asp Leu Ala Asp Met Lys Asn Lys Ala Ser Ala Tyr Glu Ser Lys Ile
 20 25 30
 Ala Glu Leu Glu Met Leu Leu Gln Gln Glu Arg His Ala Arg Glu Ser
 35 40 45
 Leu Gln Lys Ser Gln Asp Lys Leu Ala Glu Met Asn Arg Lys Leu Lys
 50 55 60
 Glu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Glu Glu Arg Asp Arg Leu Met Ala Gln
 65 70 75 80
 Arg Asp Glu Val Gln Arg Glu Val Glu Ala Gln Lys Val Ala Met Ala
 85 90 95
 Lys Lys Glu Ala Glu Lys Ala Gln Ala Glu Ala Glu Leu Arg Arg Met
 100 105 110
 Arg Glu Lys His Asp Ala Lys His Lys Ser Gln Val Asn Gly Ser Gly
 115 120 125
 Asp Ala Ala Ser Gln Asp Asp Glu Ser Glu Ala Lys Glu Leu Glu Val
 130 135 140
 Ile Pro Asn Val Arg Arg Thr Glu Glu Ser Arg Val Thr Ala Val Ser
 145 150 155 160
 Lys Asn Glu Thr Leu Gln Thr Lys Leu Ala Asn Leu Lys Met Glu Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Arg Asp Gln Ser Lys Met Arg Leu Glu His His His His
 180 185 190
 His His

10 <210> 17
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Em95-His

15 <400> 17

ES 2 714 513 T3

Gln	Glu	Tyr	Arg	Gly	Arg	Gly	Ile	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Glu	Ser	Pro
1				5					10					15	
Leu	Arg	Lys	His	Phe	Ser	Leu	Thr	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Asp	Val	Gln	His	Leu	Pro	Asp	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Ile
		35					40					45			
Ser	Leu	Lys	Ala	Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Tyr	Lys	Arg	Gln
	50					55					60				
Thr	Ala	Gln	Phe	Ser	Asp	Gly	Gln	Leu	Ala	Ile	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro
65					70					75					80
Ser	Thr	Leu	Tyr	Gln	Met	Thr	Val	Glu	Ala	Val	Arg	Gly	Lys	Asn	Thr
				85					90					95	
Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Glu	Asp	Ile	Lys	Thr	Leu	Arg	Ile	Gly	Glu	Lys
			100					105					110		
Glu	Ser	Thr	Val	Met	Thr	Ser	Gly	Ser	Ala	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Ala
		115					120					125			
Gly	Phe	Val	Phe	Ser	Cys	Ile	Val	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Glu	His	His
	130					135					140				
His	His	His	His												
145															

REIVINDICACIONES

1. Un transportador útil para el diagnóstico que comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra de un sujeto, en la que el transportador comprende adicionalmente

- 5 (a) medios para capturar específicamente anticuerpos contra uno o más polipéptidos de p7 y p16/18 procedentes de *Echinococcus multilocularis*, y
 (b) medios para capturar específicamente anticuerpos contra uno o más polipéptidos de AgB8/1a definido en la SEQ ID NO:1, AgB8/1 b definido en la SEQ ID NO:2, AgB8/2 definido en la SEQ ID NO:3, AgB8/3 definido en la SEQ ID NO:4, AgB8/4a definido en la SEQ ID NO:5 y AgB8/4b definido en la SEQ ID NO:6 procedentes de
 10 *Echinococcus granulosus*, y Em18 definido en la SEQ ID NO:7 y Em95 definido en la SEQ ID NO:8 procedentes de *Echinococcus multilocularis*,

en el que p21 es un peso molecular que tiene un peso molecular aparente de 21 kDa según se analiza mediante SDS PAGE en condiciones reductoras.

15 2. El transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transportador comprende un medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos de p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis*.

3. El transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* es el respectivo polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* o una variante del mismo, preferentemente en una
 20 forma natural del polipéptido, en el que una variante es un polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos que son al menos un 90 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de referencia referenciada.

4. El transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra un polipéptido del grupo que comprende p21, p7, p16/18 y p25/26 procedentes de *Echinococcus multilocularis* se proporciona en forma de un extracto polipeptídico procedente de *Echinococcus*, preferentemente *Echinococcus multilocularis* separado por pesos moleculares, en el
 25 que el extracto polipeptídico comprende p16/18 y p21 que se han separado lo suficiente para permitir la distinción entre un anticuerpo contra p16/18 de otro anticuerpo contra p21.

5. El transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio para capturar específicamente un anticuerpo contra uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* es el respectivo polipéptido del grupo que comprende AgB8/1a, AgB8/1b, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4a y AgB8/4b procedentes de *Echinococcus granulosus*, Em18 y Em95 procedentes de *Echinococcus multilocularis* o una variante de los mismos, proporcionados preferentemente en la
 30 forma de uno o más polipéptidos recombinantes y/o, en el que una variante es un polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos que son al menos un 90 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de referencia referenciada.
 35

6. Un kit que comprende el transportador útil para el diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que preferentemente comprende además un medio para detectar cualquier anticuerpo capturado.

40 7. Un procedimiento para comprender la etapa de detectar un anticuerpo contra p21 procedente de *Echinococcus multilocularis* en una muestra de un sujeto y que comprende detectar además

- (a) anticuerpos contra uno o más polipéptidos de p7 y p16/18; y
 (b) anticuerpos contra uno o más polipéptidos de AgB8/1a definido en la SEQ ID NO:1, AgB8/1b definido en la SEQ ID NO:2, AgB8/2 definido en la SEQ ID NO:3, AgB8/3 definido en la SEQ ID NO:4, AgB8/4a definido en la
 45 SEQ ID NO:5 y AgB8/4b definido en la SEQ ID NO:6 procedentes de *Echinococcus granulosus*, y Em18 definido en la SEQ ID NO:7 y Em95 definido en la SEQ ID NO:8 procedentes de *Echinococcus multilocularis*,

en el que p21 es un peso molecular que tiene un peso molecular aparente de 21 kDa según se analiza mediante SDS PAGE en condiciones reductoras.

50 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además detectar un anticuerpo contra uno o más polipéptidos de p25/26.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que los anticuerpos contra más de uno de los polipéptidos de dicho grupo se detectan simultáneamente.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que los anticuerpos contra más de uno de los polipéptidos se detectan en reacciones de unión espacialmente separadas o en una reacción en un

único recipiente, preferentemente en una reacción en un único recipiente.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que un anticuerpo contra p21 se detecta independientemente y se puede distinguir de un anticuerpo que se une a p16/18.

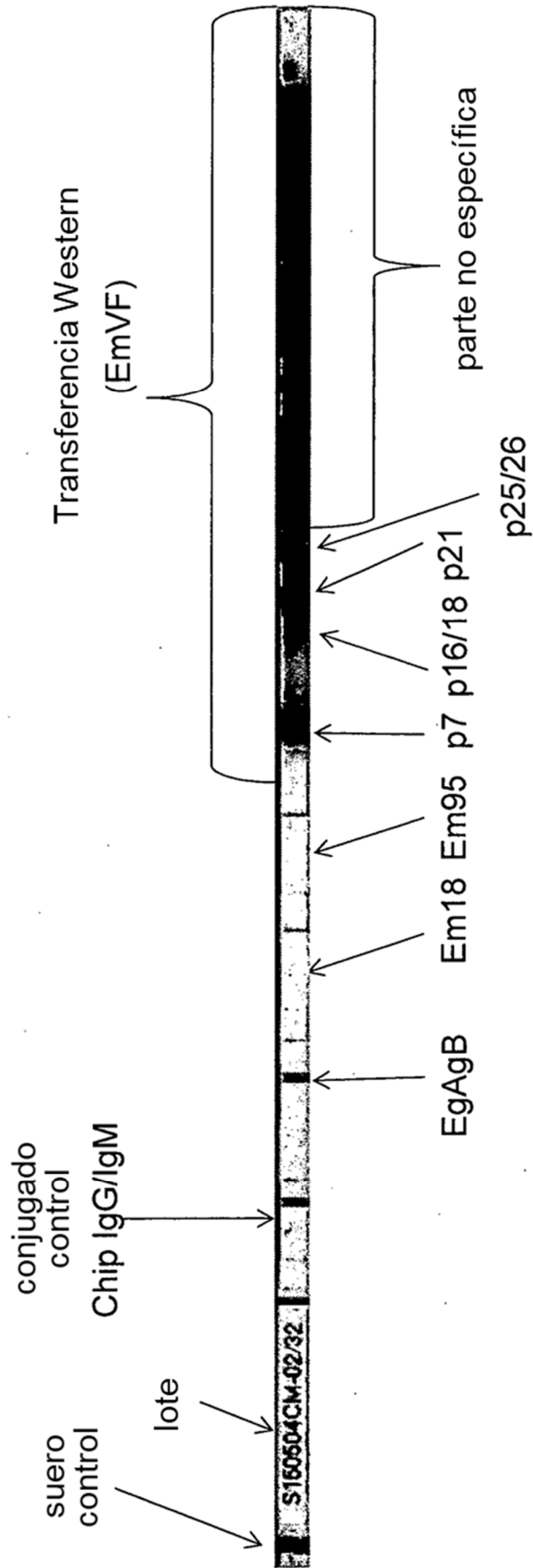


Fig. 1

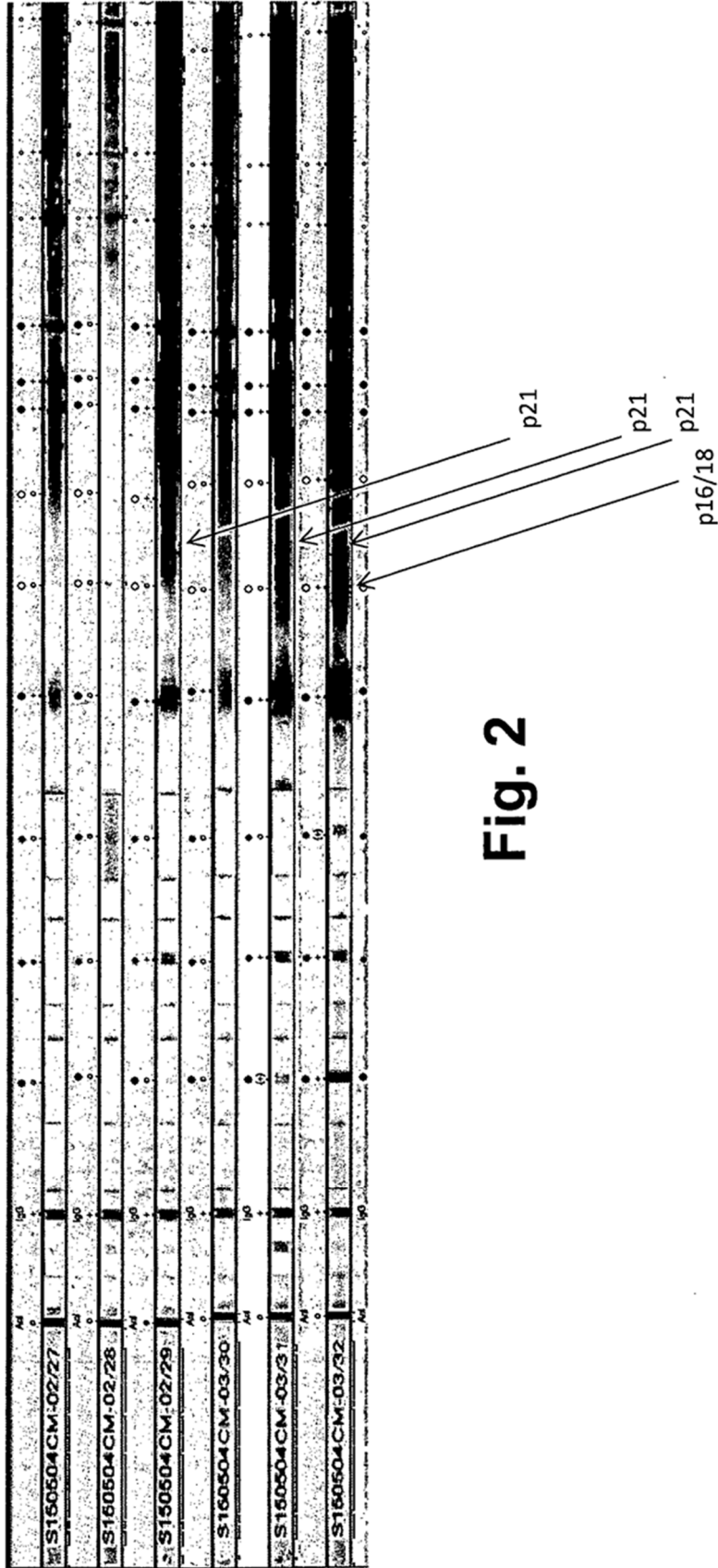


Fig. 2

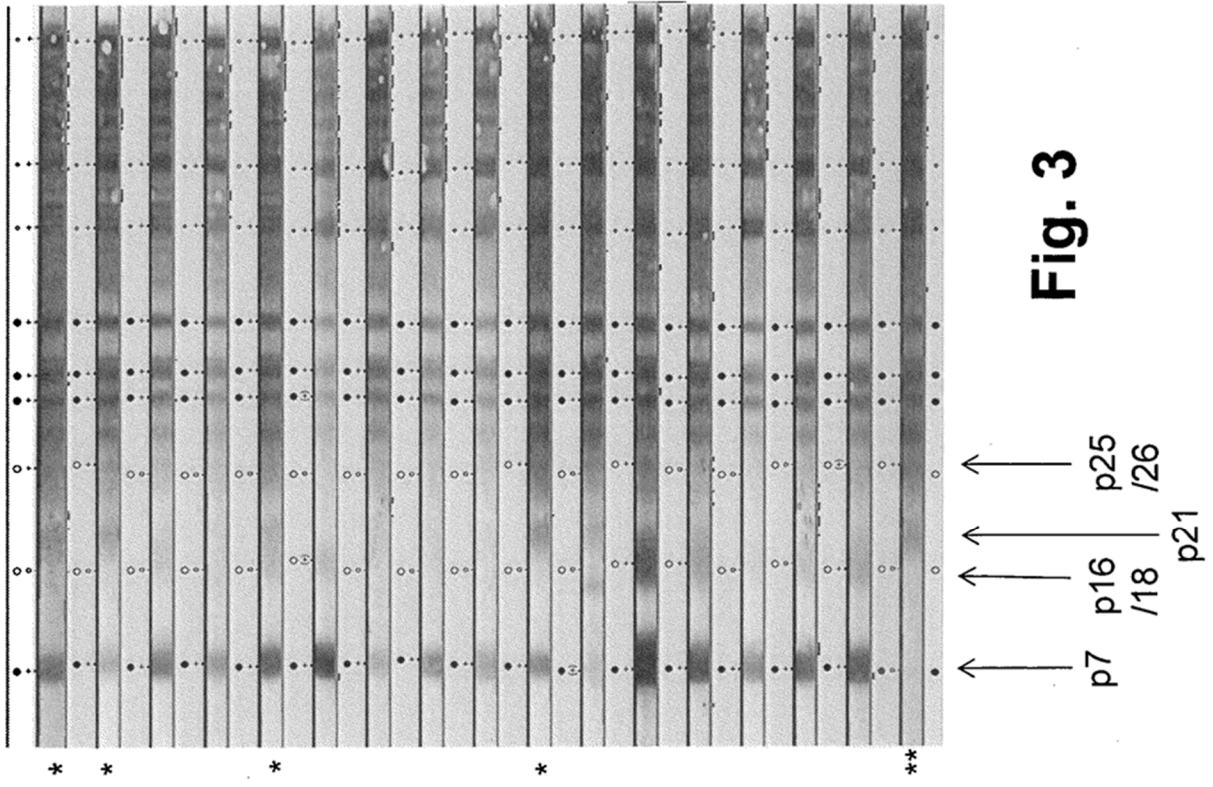


Fig. 3