

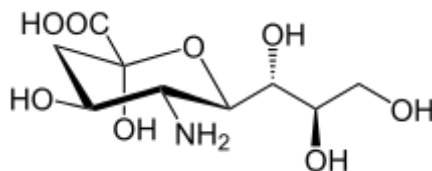
DIAGNÓSTICO DE LA VAGINOSIS BACTERIANA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la detección de la actividad de escisión de una enzima sialidasa y al uso de la misma para detectar la vaginosis bacteriana. En particular, la invención proporciona péptidos y moléculas indicadoras específicamente diseñados útiles para detectar la actividad de escisión de una enzima sialidasa. Varios otros aspectos de la invención incluyen un dispositivo de detección de enzimas, kit, método y uso para detectar o medir la presencia en una muestra de prueba de la actividad de una enzima sialidasa capaz de escindir una molécula indicadora de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enzimas sialidasa (también conocidas como neuraminidasas) son enzimas glucósido hidrolasa divididas en dos clases principales que escinden los ácidos exo o endo (poli)siálico (EC 3.2.1.18 y EC 3.2.1.129 respectivamente). Los ácidos siálicos son derivados del ácido neuramínico sustituidos en *N* u *O* (que se muestran a continuación):



Los ácidos siálicos se encuentran generalmente en la naturaleza en glicoproteínas y glicolípidos (en particular gangliósidos). Las sialidasas virales, bacterianas y de mamíferos son todas conocidas en la naturaleza. Se sabe que los niveles elevados de actividad de la sialidasa bacteriana actúan como un marcador de diagnóstico para la vaginosis bacteriana (BV; Briselden y otros, *J. Clin. Microbiol.*, 1992, vol. 30, páginas 663-666). La teoría detrás de esto se basa en el desequilibrio bacteriano que puede ocurrir en la vagina y la transición de un ambiente saludable típico rico en lactobacilos a un microbioma impulsado por anaerobios (Petrova y otros, *Front. Physiol.*, 2015, 6:81). Ciertos anaerobios excretan la enzima sialidasa y comprometen las barreras mucosas naturales en la vagina. No obstante, el mecanismo exacto de la VB aún no se ha establecido por completo. Las pacientes que padecen VB sintomática pueden experimentar un malestar significativo, flujo vaginal, un olor desagradable y, en general, una sensación de falta de control sobre su salud vaginal (Bilardi y otros, *Plos One*, 2013,

vol. 8, e74378). Las vías de tratamiento suelen incluir antibióticos tópicos u orales. Los tratamientos prebióticos tópicos (por ejemplo, VH essentials ®) y el gel de pH (por ejemplo, Balance Active BV) también están disponibles sin receta. La VB puede ser intratable y los pacientes pueden sufrir una recaída después del tratamiento con antibióticos (Bilardi y otros, *Plos One*, 2013, vol. 8, e74378). Se cree que algunos de los casos intratables están relacionados con la formación de biopelículas en la vagina (Verstraelen & Swidsinski, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2013, 26:86-89). Los riesgos de no detectar la presencia de la VB son una mayor susceptibilidad a las infecciones de transmisión sexual (incluyendo el VIH) y un riesgo asociado de parto prematuro. Se cree que el riesgo de nacimiento prematuro está relacionado con el debilitamiento prematuro de la barrera del moco cervical (Lewis y otros, *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, páginas 12067-12079). Actualmente en la clínica, la prueba de la VB se basa en un frotis de muestra vaginal que se envía para su análisis en el laboratorio. Los métodos de análisis incluyen la búsqueda de células clave, la prueba de olor a hidróxido de potasio (KOH) o la aplicación de criterios establecidos tal como la puntuación de Nugent (Nash, Jungmann y Gubert, *BMJ Learning*, 2015, 1-29). El uso de una prueba rápida en el punto de atención beneficiaría al paciente al brindar una respuesta rápida, colocarlo en un plan de tratamiento inmediato y acelerar el proceso general para obtener resultados. Del mismo modo, el proveedor de atención médica podría potencialmente beneficiarse, al evitar la subcontratación a un laboratorio y los costos de recursos y tiempo involucrados y reducir el tiempo del paciente a una sola sesión en primera instancia.

Actualmente, hay dos tipos principales de productos para el diagnóstico de la VB disponibles en EE. UU. y Europa. Un juego de productos se basa en un hisopo que cambia de color y mide el pH. El otro conjunto de productos también es colorimétrico y se basa en la medición de la actividad de la sialidasa. Los productos a base de pH están disponibles en el punto de atención y sin receta e incluyen VS-SENSEPRO® (vendido por Common Sense) y Canestest® (vendido por Canesten). El principal producto actualmente en venta basado en la detección de sialidasa es el BV Blue (vendido por Sekisui Diagnostics y Gryphus Diagnostics). BV Blue es una prueba basada en hisopos; se coloca un hisopo de muestra en una solución indicadora que cambiará de color para indicar la presencia de actividad de sialidasa en la muestra. La prueba tarda aproximadamente 15 minutos en ejecutarse.

Las pruebas basadas en el pH carecen de precisión ya que diversas condiciones pueden provocar un cambio en el pH local de la vagina (por ejemplo, candidiasis y

tricomoniasis, así como VB). Las pruebas conocidas, como BV Blue, que detectan la actividad de la sialidasa, carecen de sensibilidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resulta de los intentos de mejorar la sensibilidad y/o especificidad de la detección de la actividad de la sialidasa. Los presentes inventores han diseñado ahora específicamente péptidos y moléculas indicadoras correspondientes útiles para detectar la actividad de escisión de una enzima sialidasa. Como se describe adicionalmente en la presente descripción, cada péptido se conjuga a un grupo sialilo a través de un grupo galactosilo (y por lo tanto funciona como un sustrato para una enzima sialidasa) en el que la arquitectura del péptido se diseña específicamente para que, una vez que el grupo sialilo se ha escindido del péptido por una o más enzimas de sialidasa presentes en la muestra, el derivado desialilado del péptido es reconocido y unido por moléculas de unión específicas (por ejemplo, anticuerpos). En modalidades preferidas, el péptido incorpora uno o más aminoácidos que potencian la resistencia del péptido a la escisión por proteasa.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un péptido comprende una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula:



(Fórmula I) (SEQ ID NO: 9)

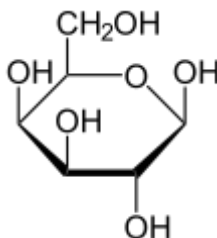
en donde:

- (i) Sial es un grupo sialilo;
- (ii) X_3 es un aminoácido natural o no natural que comprende un grupo aceptor de glicosilo; y
- (iii) X_1 , X_2 , X_4 y X_5 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido siempre que al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 sea un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural.

El péptido puede consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de Fórmula I.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, por "grupo sialilo" se entiende un sustituyente de ácido siálico en donde un ácido siálico es un derivado sustituido en *N*- u *O*- del ácido neuramínico (por ejemplo, ácido *N*- acetilneuramínico; denominado 'Neu5Ac' o 'NANA').

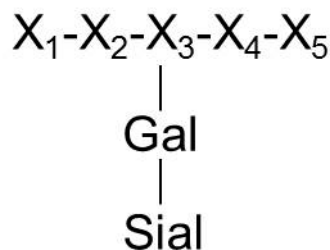
De acuerdo con todos los aspectos de la invención, por “Gal” se entiende un sustituyente galactosilo. En modalidades preferidas, el sustituyente galactosilo es un radical de la siguiente estructura:



En modalidades particulares, el sustituyente galactosilo es un radical de β -galactosa. En tales modalidades, el sustituyente galactosilo está O-enlazado al grupo sialilo. Todos los regioisómeros posibles están incluidos en la invención. El experto en la materia también apreciará que pueden usarse otros sacáridos en lugar de un grupo galactosilo, radicales de tales como por ejemplo, glucosa, fructosa, lactosa, maltosa y sacarosa. Por tanto, la referencia a un “sustituyente galactosilo” en la presente invención debe interpretarse en consecuencia.

El grupo -Gal-Sial se conjuga con X_3 como se muestra anteriormente en el que X_3 es un aminoácido natural o no natural que comprende un grupo aceptor de glicosilo. Es decir, la cadena lateral del aminoácido representado por X_3 comprende un sustituyente nucleófilo que forma un enlace con el sustituyente Gal (es decir, un donante de glicosilo). Por ejemplo, el sustituyente nucleófilo puede ser un sustituyente hidroxilo o amina. Por lo tanto, en modalidades particulares, X_3 puede seleccionarse a partir de serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), hidroxilisina (Hyl), hidroxiprolina (Hyp), asparagina (Asn), arginina (Arg) y fosfoserina (SEP). En modalidades preferidas, X_3 es Ser.

Debe entenderse a partir de la Fórmula I que el grupo-Gal-Sial se une a X_3 solamente (como se indica mediante los corchetes en la Fórmula I). No se une X_3 a X_4 . Para evitar dudas, a continuación se muestra una fórmula (Ia) alternativa y equivalente:



(Fórmula Ia)

Por tanto, el grupo –Gal-Sial se ramifica a partir de la estructura del péptido. Por tanto, el sustituyente –Gal se coloca en el centro de la estructura de modo que está flanqueado por los aminoácidos X₁, X₂, X₄ y X₅. En consecuencia, como se describe más adelante en la presente descripción, las moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpos) pueden generarse con muy alta afinidad y especificidad por el derivado desialilado de cada péptido y se minimiza la generación de moléculas de unión periféricas (por ejemplo, anticuerpos) que carecen de interacción con el sustituyente Gal.

X₁, X₂, X₄ y X₅ se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido (natural y no natural) siempre que al menos uno de X₁, X₂, X₄ y X₅ sea un D-aminoácido y/o (i) un aminoácido no estándar o (ii) un aminoácido no natural. Los aminoácidos no estándar y no naturales se suman a la diversidad de secuencia y ayudan a promover una respuesta inmune en un organismo huésped cuando se generan moléculas de unión que son anticuerpos con alta afinidad por el derivado desialilado del péptido. Los D-aminoácidos ayudan a reducir la susceptibilidad a las proteasas. En modalidades particulares, al menos dos, tres o los cuatro de X₁, X₂, X₄ y X₅ son un D-aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural.

El experto en la materia estará muy familiarizado con los términos aminoácidos “naturales” y “no-naturales”. Para evitar dudas, un aminoácido “natural” es uno que se encuentra en la naturaleza e incluye aminoácidos estándar y no estándar. Como se conoce en la técnica, los aminoácidos estándar son aquellos que están codificados directamente por codones tripletes en el código genético universal. Por el contrario, los aminoácidos no estándar son aquellos que se encuentran en la naturaleza pero que no están codificados directamente por codones tripletes en el código genético universal. Los aminoácidos “no-naturales” son aquellos que no se encuentran en la naturaleza pero que solo existen mediante síntesis artificial. Como se usa en la presente descripción, la referencia a un aminoácido por su nombre sin prefijo “D” o “L” se usa para significar tanto estereoisómeros D como L. El uso de un prefijo “D” o “L” denota ese estereoisómero específico.

El “derivado desialilado” de un péptido o molécula indicadora es el producto producido por la escisión de un grupo sialilo del péptido o molécula indicadora, típicamente por una enzima sialidasa. Por tanto, el “derivado desialilado” de un péptido o molécula indicadora típicamente difiere solo o esencialmente solo, del péptido sialilado o molécula indicadora, con respecto a la ausencia del grupo sialilo. Por lo tanto, debe entenderse que cualquier referencia en la presente descripción a un “derivado

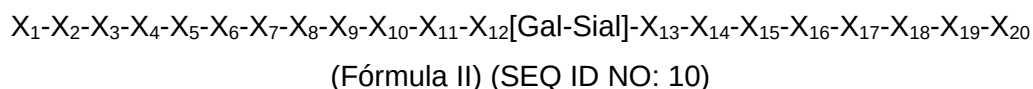
desialilado" de un péptido o molécula indicadora significa la forma desialilada de ese péptido o molécula indicadora.

Es beneficioso aumentar además la diversidad de la topología de la secuencia de péptidos, ya que se ha demostrado que promueve aún más la generación de moléculas de unión con una afinidad y especificidad muy altas para el derivado desialilado de cada péptido. Esto es particularmente relevante para las moléculas de unión que son anticuerpos. Por tanto, en modalidades preferidas, X_1 , X_2 , X_4 y X_5 comprenden al menos dos, tres o cuatro aminoácidos diferentes. En algunas modalidades, al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido hidrófobo. Por ejemplo, al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 puede seleccionarse entre alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), prolina (Pro), D -alanina (D Ala), ácido 1-aminociclohexanocarboxílico (Cyc), β -alanina (β Ala), norleucina (Nle), norvalina (Nva), Ácido 2'-(aminometil)bifenil-2-carboxílico (Bip) y ciclohexilalanina (Cha). Preferentemente, se emplea el estereoisómero L de Nle, Nva y Cha. En modalidades adicionales, al menos dos o tres de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son un aminoácido hidrófobo. Los cuatro de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 pueden ser un aminoácido hidrofóbico siempre que al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 sea un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural. En modalidades particulares, el al menos un aminoácido hidrófobo es Ala. En otras modalidades, ambos X_1 y X_2 son Ala. En modalidades preferidas, Ala es D Ala o β Ala. En otras modalidades, cada aminoácido hidrofóbico se selecciona de D Ala, β Ala, Ile, Val, Pro, Nle, Nva, Cyc, Cha y Bip. Adicional o alternativamente, en algunas modalidades al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido cargado. Por ejemplo, al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 puede seleccionarse entre arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), ornitina. (Orn) y fosfoserina (SEP). Preferentemente, se emplea el estereoisómero L de Orn y el estereoisómero D de Asp. En otras modalidades, al menos dos o tres de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son un aminoácido cargado. Los cuatro de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 pueden ser un aminoácido cargado siempre que al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 sea un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural. En modalidades particulares, cada aminoácido cargado se selecciona de Arg, Glu, D Asp, L Orn y SEP. Adicional o alternativamente, en algunas modalidades al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido polar. Por ejemplo, al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 puede seleccionarse entre serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), asparagina (Asn), glutamina (Gln) y cisteína (Cys). Preferentemente, se emplea el D estereoisómero de Ser. En otras modalidades, al menos dos o tres de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son un aminoácido polar. Los cuatro

de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 pueden ser un aminoácido polar siempre que al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 sea un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural. En modalidades particulares, cada aminoácido polar se selecciona de L Ser, D Ser y Thr. En modalidades preferidas, para maximizar la diversidad de la topología de la secuencia de péptidos, X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son una combinación de aminoácidos hidrófobos, cargados y polares. Pro y β Ala en particular son útiles en los péptidos de la invención ya que estos funcionan como “grupos bisagra” que permiten grados adicionales de libertad en el pliegue estructural general, aumentando así aún más la diversidad de la topología de la secuencia del péptido.

En modalidades preferidas, el péptido tiene un peso molecular de menos de 5000 daltons. Esto facilita la estimulación de una respuesta inmune en el organismo huésped para la generación de anticuerpos que se unen al derivado desialilado del péptido. Por tanto, en modalidades particulares, el péptido puede tener entre 5 y 20 aminoácidos de longitud, con mayor preferencia entre 9 y 20 aminoácidos de longitud.

Por tanto, en un aspecto relacionado, la invención proporciona un péptido que comprende una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula:



en donde:

Sial es un grupo sialilo

X_1 está ausente o es Thr

X_2 está ausente o es D Ala

X_3 está ausente o es Nle

X_4 está ausente o es Glu

X_5 está ausente o es D Ala

X_6 está ausente o es Arg

X_7 está ausente o se selecciona de Glu, Arg, Ser, Nva, β Ala

X_8 está ausente o se selecciona de D Ser, D Ala, SEP, Cyc

X_9 está ausente o se selecciona de Nva, BIP, D Ala, β Ala, Orn

X_{10} se selecciona de Cyc, Ser, Ile, D Ala, D Ser

X_{11} se selecciona de D Ala, Pro, Orn, Nle

X_{12} se selecciona de Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp, Asn, Arg o SEP

X_{13} se selecciona de D Ala, BIP, β Ala

X_{14} se selecciona de Arg, D Asp, Nle, Orn, Nva

X_{15} está ausente o se selecciona de Phe, BIP, Ser, Glu, D Ala, D Ser

X₁₆ está ausente o se selecciona de _DSer, Glu

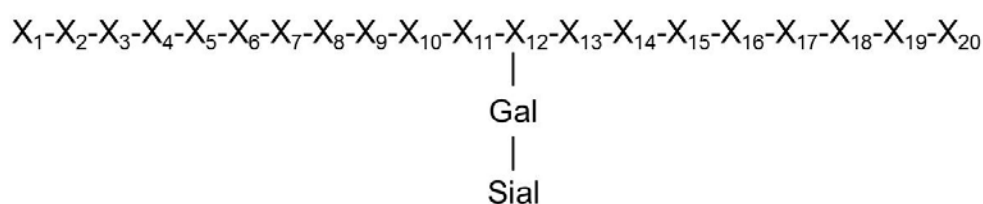
X₁₇ está ausente o se selecciona de Val, Ser, Thr

X₁₈ está ausente o es Cha

X₁₉ está ausente o es _DSer

X₂₀ está ausente o es Val.

Debe entenderse a partir de la Fórmula II que el grupo -Gal-Sial está unido a X₁₂ solamente (como se indica por los corchetes en la Fórmula II). No se une X₁₂ a X₁₃. Para evitar dudas, a continuación se muestra una fórmula (IIa) alternativa y equivalente:



(Fórmula IIa)

Por tanto, el grupo –Gal-Sial se ramifica a partir de la estructura del péptido. Por tanto, el sustituyente –Gal se coloca de modo que esté flanqueado por los aminoácidos X₁₀₋₁₁ y X₁₃₋₁₄, así como los aminoácidos X₁₋₉ y X₁₅₋₂₀ (si están presentes). En consecuencia, como se describe más adelante en la presente descripción, las moléculas de unión (por ejemplo, anticuerpos) pueden generarse con muy alta afinidad y especificidad por el derivado desialilado de cada péptido y se minimiza la generación de moléculas de unión periféricas (por ejemplo, anticuerpos) que carecen de interacción con el sustituyente Gal.

En modalidades preferidas, X₁₂ es Ser.

En modalidades particulares, de acuerdo con todos los aspectos de la invención, el péptido comprende, consiste esencialmente en o consiste en la siguiente secuencia:

- (i) Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg (SEQ ID NO: 11)
 - (ii) Glu-_DSer-Nva-Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg-Phe-_DSer-Val (SEQ ID NO: 12)
 - (iii) Arg-_DAla-Bip-Ser-Pro-Ser[Gal-Sial]-_DAla-_DAsp-Ser (SEQ ID NO: 13)
 - (iv) Ser-Ser(PO₃)-_DAla-Ile-Orn-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Nle-Glu (SEQ ID NO: 14)
 - (v) _DAla-Arg-Nva-_DSer-βAla-_DAla-Nle-Ser[Gal-Sial]-Bip-Orn-_DAla-Glu-Ser (SEQ ID NO: 15); o
 - (vi) Thr-_DAla-Nle-Glu-_DAla-Arg-βAla-Cyc-Orn-_DSer-Pro-Ser[Gal-Sial]-βAla-Nva-_DSer-Glu-Thr-Cha-_DSer-Val (SEQ ID NO: 16);
- de los cuales se prefiere particularmente Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg.

Los inventores han descubierto que estos péptidos específicos son particularmente útiles para detectar la actividad de la sialidasa y se describen con más detalle en la sección de Ejemplos.

Preferentemente, Nle, Nva, Orn y/o Cha (cuando están presentes) son L-Nle , L-Nva , L-Orn y L-Cha respectivamente.

En algunas modalidades, el péptido está predispuesto para la escisión por una o más sialidasas específicas al construir el péptido de modo que en consecuencia los aminoácidos que flanquean el grupo –Gal Sial aseguran la especificidad y sensibilidad de la escisión. Por tanto, las enzimas sialidasa específicas pueden tener diferentes afinidades por el péptido. Esto permite utilizar la invención para detectar la actividad de sialidasa específica en la muestra de prueba. Como se describe en la presente descripción, los péptidos de la invención son particularmente útiles para detectar vaginosis bacteriana. Por tanto, en modalidades preferidas, una o más sialidasas específicas son de origen bacteriano. En particular, la una o más sialidasas específicas pueden ser de *Prevotella*, *Bacteroides* y/o especies *Mobiluncus* y/o *Gardnerella vaginalis*.

En un aspecto relacionado, los péptidos de la invención se incorporan en una molécula indicadora para su uso en la detección de la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa. La molécula indicadora es un componente central de los dispositivos de detección de enzimas, kits de detección de enzimas, composiciones de materia de detección de enzimas y métodos para detectar la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa que se describe más adelante en la presente descripción. Las moléculas indicadoras descritas en la presente descripción se han desarrollado específicamente por los inventores en el contexto de la detección de la actividad de la sialidasa para diagnosticar la VB basándose en la descripción anterior de los inventores del concepto general de una molécula indicadora para usar en la detección de la actividad de escisión de una enzima y moléculas de unión que se unen específicamente al producto escindido (ver documento de patente PCT/GB2014/053171 que se incorpora en la presente como referencia). Por tanto, la invención proporciona una molécula indicadora para su uso en la detección de la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, comprendiendo la molécula indicadora:

- a) un péptido de la invención como se describe en la presente descripción; y
- b) un sitio de captura que permanece intacto después de la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por una enzima sialidasa presente en la muestra.

El sitio de captura es una región discreta de la molécula indicadora que media la unión de la molécula indicadora a una molécula de captura presente dentro de una zona de captura (como se describe con mayor detalle a continuación). Por tanto, el sitio de captura es la parte de la molécula indicadora responsable de retener o localizar la molécula indicadora dentro de la zona de captura. Después de la escisión de la molécula indicadora, el sitio de captura puede permanecer intacto o esencialmente intacto, de modo que el sitio todavía es reconocido y unido por una molécula de captura presente dentro de la zona de captura del dispositivo. Bajo estas circunstancias, tanto las moléculas indicadoras intactas como la parte de las moléculas indicadoras que comprenden el sitio de captura después de la escisión se unirán para capturar moléculas dentro de la zona de captura. El sitio de captura puede comprender cualquier molécula adecuada, por ejemplo, una molécula de biotina o una porción de oxima. El sitio de captura puede estar en el extremo N o C terminal del péptido. La clave para la eficacia de la molécula indicadora es la inmovilización a través de la interacción entre el sitio de captura y una molécula de captura en la zona de captura y la unión simultánea de una molécula de unión después de ocurrir la escisión.

Por tanto, la molécula indicadora intacta puede comprender una porción del sitio de captura unido a un péptido de la invención, cuyo péptido comprende un primer grupo sialilo. La escisión de la molécula indicadora por una enzima sialidasa produce un fragmento que comprende la porción del sitio de captura y la forma desialilada del péptido. El fragmento (es decir, la molécula indicadora escindida) difiere estructuralmente de la molécula indicadora intacta en la que se carece del primer grupo sialilo que está presente en la molécula indicadora intacta. Esta carencia del primer grupo sialilo revela o expone en el fragmento un epítipo (un nuevo sitio de unión) que está ausente, oculto o inaccesible en la molécula indicadora intacta. Por lo tanto, puede considerarse que la molécula indicadora intacta comprende un epítipo críptico. Como se analiza a continuación, las moléculas de unión de los dispositivos, kits, composiciones de materia y métodos de la invención son específicas para este epítipo y, por lo tanto, se unen solo, o preferentemente, al fragmento indicador en comparación con el indicador intacto.

El péptido de la molécula indicadora y el sitio de captura pueden asociarse por cualquier medio conocido por un experto en la técnica. En una modalidad preferida, el péptido y el sitio de captura pueden asociarse mediante un enlace covalente directo. El péptido y el sitio de captura pueden estar inmediatamente adyacentes o pueden estar separados por un enlazador o espaciador, por ejemplo, una porción de polietilenglicol

(PEG). En algunas modalidades, el péptido está unido a un grupo biotina en su extremo N- o C- a través de un enlazador que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en una porción de polietilenglicol. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos adicionales en el extremo N- o C- del péptido para unir el grupo enlazador (tal como PEG) al péptido. El uno o más aminoácidos adicionales pueden comprender Asp en algunas modalidades. La porción de PEG puede comprender además un grupo funcional (por ejemplo, un grupo amina, opcionalmente un grupo alquilamina) en uno o ambos extremos de la porción de PEG que puede reaccionar con el residuo terminal del péptido y/o el sitio de captura (por ejemplo, una molécula de biotina) durante la síntesis para unir el péptido y el sitio de captura entre sí. Por tanto, en modalidades particulares, la molécula indicadora comprende, consiste esencialmente o consiste en la siguiente estructura:

- (i) Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg-PEG-Biotina (SEQ ID NO: 11-PEG-Biotina)
 - (ii) Biotina-PEG-Asp-Glu-_DSer-Nva-Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg-Phe-_DSer-Val (Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 12)
 - (iii) Biotina-PEG-Asp-Arg-_DAla-BIP-Ser-Pro-Ser[Gal-Sial]-_DAla-_DAsp-Ser (Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 13)
 - (iv) Biotina-PEG-Asp-Ser-SEP-_DAla-Ile-Orn-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Nle-Glu (Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 14)
 - (v) Biotina-PEG-Asp-_DAla-Arg-Nva-_DSer-βAla-_DAla-Nle-Ser[Gal-Sial]-BIP-Orn-_DAla-Glu-Ser (Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 15); o
 - (vi) Biotina-PEG-Asp-Thr-_DAla-Nle-Glu-_DAla-Arg-βAla-Cyc-Orn-_DSer-Pro-Ser[Gal-Sial]-βAla-Nva-_DSer-Glu-Thr-Cha-_DSer-Val (Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 16);
- de los cuales se prefiere particularmente Cyc-_DAla-Ser[Gal-Sial]-_DAla-Arg-PEG-Biotina (SEQ ID NO: 11-PEG-Biotina).

Dentro del contexto de la presente invención, las moléculas indicadoras (a través del sitio de captura) pueden unirse a las moléculas de captura en una zona de captura (como se describe con mayor detalle a continuación) con una afinidad relativamente alta. En algunas modalidades, la constante de disociación (k_d) para la molécula de indicador será relativamente baja, y preferentemente entre 0M y 1×10^{-7} M (en dependencia de la sensibilidad requerida del ensayo). En ciertas modalidades de la invención, la constante de disociación para la molécula indicadora estará entre 1×10^{-15} M y 1×10^{-9} M.

En determinadas modalidades de la invención, dicha interacción de unión puede conseguirse como resultado de la unión directa del sitio de captura de la molécula

indicadora a la molécula de captura presente en la zona de captura. En este contexto, la unión directa significa la unión de la molécula indicadora (a través del sitio de captura) a la molécula de captura sin ningún intermediario.

En modalidades preferidas de la invención, el sitio de captura de la molécula indicadora y la molécula de captura presente en la zona de captura son dos mitades de un par de unión. En este contexto, un par de unión consta de dos moléculas o entidades capaces de unirse entre sí. En determinadas modalidades de la invención, la interacción de unión es específica de modo que cada miembro del par de unión solo puede unir a su respectivo par, o un número limitado de pares de unión. Además, como se detalló anteriormente, es preferible que el par de unión muestre una afinidad relativamente alta. El par de unión puede ser un par de unión que se encuentra en la naturaleza o un par que se genera artificialmente para interactuar con moléculas o entidades.

En algunas modalidades de la invención, el sitio de captura de la molécula indicadora y la molécula de captura son dos mitades de un par de unión en donde el par de unión se selecciona entre los siguientes: -un antígeno y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este; biotina y avidina, estreptavidina, neutravidina o captavidina; una inmunoglobulina (o un dominio apropiado de este) y proteína A o G; un carbohidrato y una lectina; secuencias de nucleótidos complementarias; un ligando y una molécula receptora; una hormona y una proteína de unión a hormonas; un cofactor enzimático y una enzima; un inhibidor de enzimas y una enzima; un dominio de unión a celulosa y fibras de celulosa; ácido aminofenil borónico inmovilizado y moléculas portadoras de cis-diol; y fibras de xiloglucano y celulosa y análogos, derivados y fragmentos de estos.

En modalidades particulares de la invención, el par de unión consiste en biotina y estreptavidina. En una modalidad adicional de la invención, el sitio de captura de la molécula indicadora comprende un epítipo y la molécula de captura comprende un anticuerpo, que se une específicamente al epítipo presente en el primer sitio de captura. En el contexto de la presente invención, el término anticuerpo cubre inmunoglobulinas nativas de cualquier especie, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos F (ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos sFv y moléculas altamente relacionadas tales como las basadas en dominios de anticuerpos que retienen afinidad de unión específica (por ejemplo, anticuerpos de dominio único). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Por tanto, en modalidades específicas, la molécula de captura comprende un anticuerpo. En otras modalidades, el sitio de captura comprende una molécula de biotina y la zona de captura comprende una molécula de estreptavidina.

Otro componente central de los dispositivos de detección de enzimas, kits de detección de enzimas, composiciones de materia de detección de enzimas y métodos para detectar la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa descrita adicionalmente en la presente descripción es la molécula de unión. La molécula de unión está diseñada para unirse específicamente al derivado desialilado de la molécula indicadora formada a continuación por la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la actividad sialidasa presente en la muestra. La formación del derivado desialilado revela un nuevo sitio de unión al que la molécula de unión puede unirse específicamente. Por tanto, en modalidades preferidas, la molécula de unión no puede unirse a la molécula indicadora (en ningún nivel apreciable o detectable) a menos que y hasta que se ha producido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora. En modalidades alternativas, la molécula de unión se une preferentemente al derivado desialilado sobre el péptido sialilado o la molécula indicadora. Por tanto, la molécula de unión tiene una mayor afinidad por el derivado desialilado en comparación con la forma sialilada.

Alternativamente se ha observado, en modalidades preferidas, que la molécula de unión es capaz de unirse específicamente a la molécula indicadora (fragmento) desialilado y es incapaz de unirse a la molécula indicadora intacta (sialilada) (en cualquier nivel apreciable o detectable).

El experto en la técnica es capaz de determinar si una molécula de unión particular se une o no al derivado desialilado con preferencia a la forma sialilada. Esto puede, por ejemplo, expresarse en términos de las constantes de disociación relativas. Por ejemplo, en modalidades particulares, la constante de disociación para la interacción de unión entre la molécula de unión y el derivado desialilado puede ser 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 veces (o más) menor que la constante de disociación para la interacción de unión entre la molécula de unión y la forma sialilada.

En modalidades específicas, la molécula de unión comprende un anticuerpo. Para evitar dudas, el término anticuerpo incluye las inmunoglobulinas nativas de cualquier especie, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos F (ab')₂, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos sFv y moléculas altamente relacionadas, como las basadas en dominios de anticuerpos que retienen la afinidad de unión específica (por ejemplo, anticuerpos de dominio único). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los inventores han producido anticuerpos que solo reconocen el derivado desialilado de la molécula indicadora y, por lo tanto, no se unirán a la molécula indicadora (en ningún grado significativo) a menos que y hasta que se ha

producido la escisión del grupo sialilo. Los anticuerpos pueden producirse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Esto puede depender de la inmunización de un animal, tal como una oveja, un conejo o una cabra, con los derivados desialilados de las moléculas indicadoras. Alternativamente, el animal puede inmunizarse con los péptidos desialilados (es decir, sin que esté unido el sitio de captura). Los anticuerpos policlonales pueden aislarse del suero y purificarse por afinidad. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse con el uso de la tecnología de hibridomas bien conocida y caracterizada.

Por tanto, en un aspecto relacionado, la invención también proporciona un anticuerpo capaz de unirse específicamente al derivado desialilado de un péptido de la invención como se define en la presente o una molécula indicadora de la invención como se define en la presente. Como apreciará por la persona experta en base a la descripción en la presente, el anticuerpo puede unirse preferentemente al derivado desialilado sobre el péptido sialilado o la molécula indicadora. Por tanto, el anticuerpo tiene una mayor afinidad por el derivado desialilado en comparación con la forma sialilada. El experto en la técnica puede determinar si un anticuerpo particular se une o no al derivado desialilado con preferencia sobre la forma sialilada. Esto puede, por ejemplo, expresarse en términos de las constantes de disociación relativas. Por ejemplo, en modalidades particulares, la constante de disociación para la interacción de unión entre el anticuerpo y el derivado desialilado puede ser 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 veces (o más) menor que la constante de disociación para la interacción de unión entre el anticuerpo y la forma sialilada. En modalidades particulares, el anticuerpo es incapaz de unirse al péptido sialilado o molécula indicadora. Es decir, sólo puede unirse al derivado desialilado después de que se ha producido la escisión del grupo sialilo.

Por lo tanto, en una modalidad preferida, el anticuerpo puede unirse específicamente al epítipo:

Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Biotin a (forma desialilada de la SEQ ID NO: 11-PEG-Biotina); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula, Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg (forma desialilada de la SEQ ID NO: 11). Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula (Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg, es decir, SEQ ID NO: 11).

En otra modalidad, se proporciona un anticuerpo que puede unirse específicamente al epítipo:

Biotina-PEG-Asp-Glu-D-Ser-Nva-Cyc-D-Ala-Ser[Gal]-D-Ala-Arg-Phe-D-Ser-Val (forma desialilada de Biotina-PEG-Asp-SEC ID NO: 12); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula. Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula.

En una modalidad adicional, se proporciona un anticuerpo que puede unirse específicamente al epítipo:

Biotina-PEG-Asp-Arg-D-Ala-BIP-Ser-Pro-Ser[Gal]-D-Ala-D-Asp-Ser (forma desialilada de Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 13); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula. Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula.

En una modalidad adicional, se proporciona un anticuerpo que puede unirse específicamente al epítipo:

Biotina-PEG-Asp-Ser-SEP-D-Ala-Ile-Orn-Ser [Gal]-D-Ala-Nle-Glu (forma desialilada de Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 14); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula. Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula.

En una modalidad adicional, se proporciona un anticuerpo que puede unirse específicamente al epítipo:

Biotina-PEG-Asp-D-Ala-Arg-Nva-D-Ser-βAla-D-Ala-Nle-Ser[Gal]-BIP-Orn-D-Ala-Glu-Ser (forma desialilada de Biotina-PEG-Asp- SEQ ID NO: 15); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula. Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula.

En una modalidad adicional, se proporciona un anticuerpo que puede unirse específicamente al epítipo:

Biotina-PEG-Asp-Thr-D-Ala-Nle-Glu-D-Ala-Arg-βAla-Cyc-Orn-D-Ser-Pro-Ser[Gal]-βAla-Nva-D-Ser-Glu-Thr-Cha-D-Ser-Val (forma desialilada de Biotina-PEG-Asp-SEQ ID NO: 16); particularmente a un epítipo presente en esta molécula, más particularmente a un epítipo presente en la porción del péptido Gal de esta molécula. Preferentemente, el anticuerpo no puede unirse (en ningún nivel apreciable o detectable) a la forma sialilada de esta molécula.

En una modalidad adicional, se proporciona un anticuerpo que tiene una cadena pesada con 3 CDR y una cadena ligera con 3 CDR, en donde la CDR1 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 1; la CDR2 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 2; la CDR3 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 3; la CDR1 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 4; la CDR2 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 5; y/o la CDR3 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo puede tener una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 7 y/o una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 8.

Preferentemente, el anticuerpo puede unirse específicamente a un epítopo presente en la molécula Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg. Preferentemente, el anticuerpo no se une (en ningún nivel apreciable o detectable) a la molécula Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg.

Para la molécula (desialilada) Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Oxima (forma desialilada de la SEQ ID NO: 11-PEG-oxima) el anticuerpo puede tener una K_D de menos de 100 nM, preferentemente menos de 80, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nM, por ejemplo aproximadamente 7,9 nM. Para esta molécula, puede tener una K_{on} de aproximadamente $54080M^{-1}s^{-1}$;

y un K_{off} de aproximadamente $0,000427 s^{-1}$.

La molécula de unión puede conjugarse directa o indirectamente a (es decir, marcarse con) una molécula reportera para permitir la detección de la unión de la molécula de unión a la molécula indicadora. La molécula reportera puede ser cualquier sustancia o porción adecuada para la detección por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. Por tanto, la molécula reportera es típicamente capaz de generar o producir señales. En determinadas modalidades de la invención, la molécula reportera se selecciona entre las siguientes: - una partícula de oro; un cromógeno; un compuesto luminiscente; una molécula fluorescente; un compuesto radiactivo; un compuesto visible; un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales; una especie electroactiva; o una combinación de enzima y su sustrato. Una combinación de enzima-sustrato adecuada para usar como porción reportera puede ser la enzima fosfatasa alcalina y el sustrato de fosfato de nitroazultetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolilo. En una modalidad particular de la invención, la molécula reportera es una partícula de oro.

El marcaje indirecto de la molécula de unión con una molécula reportera también se contempla dentro de la presente invención. Por tanto, la molécula reportera puede unirse a otra molécula de unión que, a su vez, se une a la molécula de unión para

proporcionar el marcaje. Esta unión indirecta puede estar mediada por un adaptador capaz de unir simultáneamente la molécula de unión y la molécula reportera. Como una modalidad ilustrativa, cuando la molécula de unión es un anticuerpo, el marcaje indirecto podría estar mediado por un anticuerpo adicional que se una a la molécula de unión del anticuerpo de manera específica. El anticuerpo adicional puede marcarse directamente con una molécula reportera, como una partícula de oro; un cromógeno; un compuesto luminiscente; una molécula fluorescente; un compuesto radiactivo; un compuesto visible; un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales; una especie electroactiva; o una combinación de enzima y su sustrato. Una combinación de enzima-sustrato adecuada para usar como porción reportera puede ser la enzima fosfatasa alcalina y el sustrato de fosfato de nitroazultetrazolio-5-bromo-4-cloro-3-indolilo. En una modalidad particular de la invención, la porción reportera es una partícula de oro.

En modalidades en las que la reportera es una partícula de oro, el conjugado de molécula de unión a partículas de oro debe usarse con una densidad óptica de al menos 4, preferentemente al menos 5, 6 o 7, con mayor preferencia al menos o aproximadamente 8, 9 o 10.

En las modalidades de la invención en las que la molécula reportera se une a la molécula de unión en virtud de una molécula adaptadora, el adaptador puede acomplejarse previamente con la molécula de unión antes de la adición de la muestra de prueba a la molécula indicadora, siempre que el adaptador no evite la unión de la molécula de unión a la molécula indicadora escindida.

El adaptador puede ser cualquier material o molécula capaz de mediar en la interacción indirecta de la molécula de unión con la molécula reportera. En algunas modalidades, el adaptador es estreptavidina y la molécula de unión comprende una molécula de biotina. El adaptador también puede ser un “par de unión al adaptador” en donde dicho par de enlace comprende:

(i) un primer miembro capaz de unirse a la molécula de unión; y

(ii) un segundo miembro capaz de unirse al primer miembro del par y a la molécula reportera. En determinadas modalidades de la invención, la región de detección de la molécula indicadora comprende biotina, el primer miembro del par de unión del adaptador es avidina o estreptavidina, el segundo miembro del par de unión del adaptador es biotina, y la molécula reportera comprende una porción capaz de unirse a biotina.

En vista de lo anterior, en un aspecto complementario, los derivados desialilados de los péptidos de la invención también forman parte de la invención y se utilizan en la generación de las moléculas de unión, en particular anticuerpos. Por tanto, la invención proporciona un péptido para su uso en la generación de un anticuerpo como se define en la presente descripción, en donde el péptido es un derivado desialilado de un péptido de acuerdo con la invención y el anticuerpo es capaz de unirse específicamente al derivado desialilado de un péptido de la invención. Por tanto, en modalidades particulares, el péptido es:

- (i) Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg (forma desialilada de SEQ ID NO: 11)
- (ii) Asp-Glu-DSer-Nva-Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-Phe-DSer-Val (forma desialilada de SEQ ID NO: 12)
- (iii) Asp-Arg-DAla-BIP-Ser-Pro-Ser[Gal]-DAla-DAsp-Ser (forma desialilada de SEQ ID NO: 13)
- (iv) Asp-Ser-SEP-DAla-Ile-Orn-Ser[Gal]-DAla-Nle-Glu (forma desialilada de SEQ ID NO: 14)
- (v) Asp-DAla-Arg-Nva-DSer-βAla-DAla-Nle-Ser[Gal]-BIP-Orn-DAla-Glu-Ser (forma desialilada de SEQ ID NO: 15); o
- (vi) Asp-Thr-DAla-Nle-Glu-DAla-Arg-βAla-Cyc-Orn-DSer-Pro-Ser[Gal]-βAla-Nva-DSer-Glu-Thr-Cha-DSer-Val (forma desialilada de SEQ ID NO: 16).

Se prefiere particularmente un péptido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg.

En modalidades particulares, el péptido puede conjugarse con una proteína transportadora para mejorar la inmunogenicidad y por tanto la producción de anticuerpos en el organismo huésped. Por ejemplo, el péptido puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana. La proteína transportadora puede estar en el extremo N o C terminal del péptido.

En vista de lo anterior, la invención proporciona además dispositivos de detección de enzimas, kits de detección de enzimas, composiciones de materia para la detección de enzimas y métodos para detectar la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa que incorpora una molécula indicadora, moléculas de captura y moléculas de unión como se definió anteriormente. El uso de moléculas de unión, tales como anticuerpos, que se unen sólo al derivado desialilado de la molécula indicadora pero no a la molécula indicadora no escindida, permite la detección de la actividad de sialidasa a bajas concentraciones en las muestras de prueba.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas para detectar la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, comprendiendo el dispositivo:

- (i) una molécula indicadora como se define en la presente descripción;
- (ii) una zona de captura para recibir la muestra de prueba, en donde la zona de captura comprende moléculas de captura como se define en la presente capaces de unirse al sitio de captura de la molécula indicadora, independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido o no, para inmovilizar la molécula indicadora; y
- (iii) moléculas de unión como se definen en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que haya ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra.

La invención proporciona además un método para detectar la presencia o ausencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, el método comprende:

- (i) poner en contacto una molécula indicadora como se define en la presente con la muestra de prueba;
- (ii) añadir a la muestra de prueba las moléculas de unión como se define en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que se ha producido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;
- (iii) capturar el derivado desialilado de la molécula indicadora en una zona de captura mediante la unión de moléculas de captura en la zona de captura al sitio de captura, dichas moléculas de captura pueden unirse al sitio de captura independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido; y
- (iv) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura.

Los inventores demostraron que los dispositivos, kits, composiciones de materia y métodos de la invención tienen una aplicación específica en el campo del diagnóstico de la VB. Por tanto, la invención proporciona además un método para diagnosticar la

vaginosis bacteriana en una muestra de prueba mediante la detección de la actividad de escisión de una enzima sialidasa en la muestra, el método comprende:

- (i) poner en contacto una molécula indicadora como se define en la presente con la muestra de prueba;
- (ii) añadir a la muestra de prueba las moléculas de unión como se define en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que se ha producido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;
- (iii) capturar el derivado desialilado de la molécula indicadora en una zona de captura mediante la unión de moléculas de captura como se define en la presente en la zona de captura al sitio de captura, siendo capaces dichas moléculas de captura de unirse al sitio de captura independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido; y
- (iv) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura en donde un mayor nivel de escisión en comparación con un control diagnóstica la vaginosis bacteriana.

En modalidades particulares, la molécula indicadora puede (pre)inmovilizarse en la zona de captura mediante las moléculas de captura (es decir, antes de entrar en contacto con la muestra de prueba). Por tanto, la invención también proporciona un método para detectar la presencia o ausencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, el método comprende:

- (i) añadir la muestra de prueba a una zona de captura que comprende moléculas de captura, estando dichas moléculas de captura como se definen en la presente descripción unidas al sitio de captura de una molécula indicadora como se define en la presente descripción en donde dichas moléculas de captura permanecen unidas al sitio de captura independientemente de si se escinden o no del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;
- (ii) añadir moléculas de unión como se definen en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que haya ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura.

De manera similar, la invención también proporciona un método para diagnosticar la vaginosis bacteriana en una muestra de prueba mediante la detección de la actividad de escisión de una enzima sialidasa en la muestra, el método comprende:

(i) añadir la muestra de prueba a una zona de captura que comprende las moléculas de captura como se define en la presente descripción, dichas moléculas de captura están unidas al sitio de captura de una molécula indicadora como se define en la presente descripción en donde dichas moléculas de captura permanecen unidas al sitio de captura independientemente de si se escinden o no del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(ii) añadir moléculas de unión como se definen en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que haya ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora determinando la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura en la que un mayor nivel de escisión en comparación con un control diagnostica la vaginosis bacteriana.

En consecuencia, para aquellas modalidades en las que la molécula indicadora está (pre)inmovilizada en la zona de captura a través de las moléculas de captura (es decir, antes del contacto con la muestra de prueba), antes de la etapa (i) del método, la molécula indicadora puede añadirse a la zona de captura de tal manera que la molécula indicadora se une en la zona de captura a través de las moléculas de captura. La adición de las moléculas de unión puede ocurrir simultáneamente con o después de que la muestra de prueba se ha agregado a la zona de captura. Por tanto, las etapas (i) y (ii) del método pueden ocurrir secuencial o simultáneamente.

En el contexto de los métodos proporcionados en la presente descripción, debe entenderse que la etapa de “añadir” moléculas de unión a la muestra de prueba abarca cualquier etapa que ponga las moléculas de unión en contacto con la muestra de prueba. Por tanto, esta etapa puede abarcar una etapa de aplicar la muestra de prueba a un dispositivo que comprende las moléculas de unión. Las moléculas de unión pueden estar en solución o pueden estar sobre un portador. Por ejemplo, las moléculas de unión

pueden secarse o impregnarse de otro modo en un soporte sólido, que puede ser la “almohadilla de conjugado” que se analiza en otra parte de la presente descripción. En modalidades preferidas, la muestra de prueba se pone en contacto con un soporte sólido sobre el que se han secado las moléculas de unión. El líquido contenido en la muestra de prueba y/o agregado al portador permite que las moléculas de unión se resuelvan.

En modalidades en las que las moléculas de unión se secan o se impregnan de otro modo en un soporte sólido, el soporte sólido preferentemente comprende o consiste en fibra de vidrio, fibras de poliéster o un material que tiene propiedades similares. El soporte sólido debería tener preferentemente una o más de las siguientes propiedades: peso base alrededor de 75g/m^2 ; calibre aproximadamente 0,38 - 0,43 mm; tasa de absorción de aproximadamente 3-5 (s/2 cm); y/o absorción de agua aproximadamente $63\text{-}79\text{ mg/cm}^2$. Por tanto, la almohadilla conjugada puede tener estas propiedades. De manera similar, la almohadilla de muestra puede tener estas propiedades.

Mientras que en las modalidades preferidas las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que se ha producido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra, en algunas modalidades, las moléculas de unión se unen preferentemente al derivado sialilado de la molécula indicadora sobre la forma sialilada como se describe en otra parte de la presente descripción. Por tanto, puede producirse cierto grado de unión a la molécula indicadora sialilada (esto puede considerarse señal de fondo en algunos casos). Sin embargo, debido a que las moléculas de unión se unirán preferentemente al derivado desialilado se genera una señal mucho mayor en las muestras que comprenden el derivado desialilado con respecto a muestras en las que la molécula indicadora sialilada no se ha escindido o no está presente ninguna molécula indicadora.

Para tener en cuenta los niveles de fondo de la actividad sialidasa (si está presente), los métodos normalmente implican comparar los niveles medidos de escisión en la muestra de prueba con un control. Típicamente, el control representa los niveles correspondientes de actividad de sialidasa en un sujeto sano. Por “sujeto sano” se entiende un sujeto que no padece VB. El control puede estar en una muestra de prueba correspondiente tomada de un control sano emparejado. Alternativamente, el control puede estar en un nivel umbral de actividad de sialidasa establecido determinando la actividad de sialidasa en una variedad de pacientes sanos y enfermos. Los expertos en la técnica conocen bien métodos adecuados para establecer un umbral. El umbral puede derivarse matemáticamente de un conjunto de entrenamiento de datos del paciente. Por

tanto, el umbral de puntuación separa las muestras de prueba de acuerdo con la presencia o ausencia de VB. La interpretación de esta cantidad, es decir, el umbral de corte, puede derivarse en una fase de desarrollo o entrenamiento de un conjunto de pacientes con resultado conocido. Por tanto, el umbral puede fijarse antes de la ejecución de los métodos reivindicados a partir de los datos de entrenamiento mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, puede usarse un lector cúbico, por ejemplo, el lector OpTricon de OpTricon GmbH (Chembio Diagnostic Systems) de Schwarzschildstrasse 1, D-12489 Berlín, Alemania), como se demuestra en los Ejemplos. A modo de ejemplo, en los ensayos usados en los ejemplos, una lectura cúbica de menos de 10 se correlaciona con la ausencia de una señal visual y se considera un resultado negativo y por lo tanto indicativo de la ausencia de vaginosis bacteriana; y una lectura cúbica de al menos 30 unidades se correlaciona con una señal visual fuerte y se considera un resultado positivo y, por lo tanto, indicativo de la presencia de vaginosis bacteriana.

Una lectura cúbica de 10-20 unidades se correlaciona con una señal visual débil y se considera un resultado que puede ser indicativo de la ausencia de vaginosis bacteriana establecida, pero puede ser indicativo de un nivel bajo de infección, por ejemplo, la etapa temprana de la vaginosis bacteriana.

En modalidades particulares, la enzima sialidasa que se va a detectar se origina en las especies de *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Mobiluncus* y/o *Gardnerella vaginalis*.

Los dispositivos de detección de enzimas y las composiciones de materia de la invención pueden suministrarse en un formato listo para su uso inmediato. Alternativamente, los componentes esenciales pueden proporcionarse como un kit de piezas, opcionalmente junto con reactivos adecuados y/o instrucciones para el montaje del dispositivo de detección de enzimas. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un kit de detección de enzimas para detectar la presencia en una muestra de prueba de actividad de escisión de una enzima sialidasa, comprendiendo el kit:

(i) una molécula indicadora como se define en la presente para añadir a la muestra de prueba;

(ii) capturar moléculas como se definen en la presente descripción capaces de unirse al sitio de captura de la molécula indicadora, independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido o no;

(iii) un soporte sólido al que pueden unirse las moléculas de captura para formar una zona de captura para recibir la muestra de prueba; y

(iv) moléculas de unión como se definen en la presente descripción capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra ha ocurrido.

En aspectos relacionados, la invención también proporciona el uso de un dispositivo de detección de enzimas o una composición de materia como se describe y define en la presente descripción para diagnosticar la VB en una muestra de prueba. De manera similar, la invención también proporciona el uso de un método como se describe y define en la presente descripción para diagnosticar VB en una muestra de prueba. La invención proporciona además el uso de un kit de detección de enzimas como se describe y define en la presente descripción para diagnosticar la VB en una muestra de prueba.

La invención puede realizarse en dispositivos de flujo lateral o de flujo vertical en ciertas modalidades. Generalmente, por tanto, la invención se basa en alguna forma de soporte sólido. El soporte sólido puede definir una ruta de flujo de líquido para la muestra. En modalidades específicas, el soporte sólido comprende un medio cromatográfico o un dispositivo de flujo capilar. La invención puede proporcionarse en formato de tira reactiva en algunas modalidades.

En modalidades específicas de la invención, la zona de captura se forma sobre un soporte sólido. Se pretende abarcar cualquier soporte al que puedan unirse las moléculas de captura para formar una zona de captura. El soporte sólido puede tomar la forma de una perla (por ejemplo, una perla de sefarosa o agarosa) o por ejemplo un pocillo (por ejemplo, en una microplaca). Por tanto, en determinadas modalidades, el dispositivo comprende un soporte sólido al que se unen las moléculas de captura para formar la zona de captura. En el caso de los kits de la invención, el soporte sólido puede proporcionarse sin las moléculas de captura unidas. En esas modalidades, el usuario del kit puede inmovilizar las moléculas de captura en el soporte sólido para formar la zona de captura antes de usar el dispositivo con una muestra de prueba. Por tanto, el kit también puede comprender medios para inmovilizar las moléculas de captura sobre el soporte sólido. Los medios de inmovilización pueden comprender cualquier reactivo adecuado para permitir que se forme la zona de captura. El soporte sólido puede preformarse con medios de inmovilización adecuados. Por ejemplo, el soporte sólido puede comprender moléculas de biotina dispuestas para interactuar con moléculas de avidina (por ejemplo, estreptavidina) que forman (parte de) las moléculas de captura.

Por supuesto, pueden usarse otras interacciones de pares de unión para inmovilizar las moléculas de captura sobre el soporte sólido para formar una zona de captura, como se describe en la presente descripción y como comprenderá fácilmente un experto en la técnica.

La zona de captura puede estar definida por la inmovilización en ella o sobre ella de moléculas de captura capaces de unirse al sitio de captura de moléculas indicadoras. La inmovilización de moléculas de captura puede lograrse por cualquier medio adecuado. Cuando el dispositivo es un dispositivo de flujo que comprende un medio cromatográfico, las moléculas de captura pueden inmovilizarse uniéndose directamente al medio o inmovilizarse indirectamente mediante la unión a una molécula portadora, como una proteína, asociada o unida al medio.

En modalidades adicionales, el soporte sólido comprende además una zona de aplicación de la muestra a la que se aplica la muestra. La zona de aplicación de la muestra puede estar precargada con la molécula indicadora, de manera que cuando se aplica la muestra de prueba, cualquier enzima de la muestra actúa sobre el sitio de escisión de la molécula indicadora dentro de la zona de aplicación de la muestra. La zona de aplicación de la muestra puede contener una barrera, que mantiene la muestra en la zona de aplicación de la muestra durante un período de tiempo predeterminado. Esto permite que la muestra interactúe con la molécula indicadora durante un período suficiente para lograr niveles mensurables de escisión. Esto puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 60 minutos o más, dependiendo de la enzima sialidasa que se detecte, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica. Se prefieren aproximadamente 5-15 minutos, 5-10 minutos o aproximadamente 5 minutos. La barrera puede ser degradada por la muestra, o de cualquier otra manera eliminada, después de este período de tiempo, permitiendo por tanto, que la muestra continúe fluyendo a través del dispositivo. Alternativamente, la muestra de prueba y la molécula indicadora pueden premezclarse o preincubarse antes de añadir la mezcla al dispositivo, tal como en la zona de aplicación de la muestra. Sin embargo, cuando la muestra de prueba y la molécula indicadora pueden premezclarse o preincubarse, es posible omitir la zona de aplicación de la muestra. Aquí, puede ser posible agregar la mezcla directamente a la zona de captura para permitir la inmovilización de las moléculas indicadoras a través de la interacción con las moléculas de captura. En algunas modalidades, la muestra de prueba puede aplicarse al medio cromatográfico en un sitio corriente arriba de la zona de captura de manera que se extraiga, por ejemplo, por acción capilar, a través de la zona de captura. El medio cromatográfico puede estar hecho de cualquier material a

través del cual pueda pasar un fluido, como un canal fluídico o una membrana porosa. En determinadas modalidades de la invención, el medio cromatográfico comprende una tira o membrana, por ejemplo una tira o membrana de nitrocelulosa.

La molécula indicadora puede estar presente en un portador, que debería ser un material inerte y preferentemente poroso. Puede ser un polímero adecuado, tal como politetrafluoroetileno. Por ejemplo, el portador puede ser un disco de membrana porosa inerte. La molécula indicadora puede, por ejemplo, haberse liofilizado sobre el portador. En modalidades preferidas, la muestra de prueba y la molécula indicadora pueden premezclarse o preincubarse antes de añadir la mezcla al dispositivo. Esto puede implicar poner en contacto la muestra con un portador que comprende la molécula indicadora, preferentemente en forma liofilizada. Esto puede hacerse, por ejemplo, en un recipiente tal como un tubo. Preferentemente, la muestra y la molécula indicadora se incuban durante al menos 3, 4 o 5 minutos y no más de 30 minutos, preferentemente durante aproximadamente 5-15 minutos, 5-10 minutos o aproximadamente 5 minutos, por ejemplo 3-7 o 4-6 minutos.

El experto en la técnica podrá determinar cantidades y concentraciones adecuadas de los diversos componentes, pero a modo de ejemplo para un único ensayo o en un único kit, la molécula indicadora está presente preferentemente en una cantidad de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 ng, con mayor preferencia al menos o aproximadamente 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o 190 ng.

Las moléculas de unión deben proporcionarse en el dispositivo de una manera que permita la interacción con la molécula indicadora, si el grupo sialilo se escinde de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra. Por lo tanto, las moléculas de unión pueden premezclarse con las moléculas indicadoras antes de la aplicación al dispositivo. Esto puede ser antes o después de que las moléculas indicadoras se han mezclado con la muestra de prueba. Es preferentemente después para evitar cualquier efecto que las moléculas de unión puedan tener sobre la actividad enzimática (en la muestra de prueba) en el sitio de escisión de la molécula indicadora. Las moléculas de unión pueden proporcionarse preferentemente sobre o en el dispositivo en cualquier punto corriente arriba de la zona de captura, de modo que las moléculas de unión encuentren la muestra de prueba y las moléculas indicadoras antes de que las moléculas indicadoras se inmovilicen (mediante la interacción entre el sitio de captura de la molécula indicadora y moléculas de captura que definen la zona de captura). Alternativamente, la molécula de unión puede añadirse a la zona de captura después de que la muestra de prueba y las moléculas indicadoras se han añadido a la

zona de captura. Esto asegura que cualquier molécula indicadora ya estará inmovilizada en la zona de captura, proporcionando (en el caso de molécula indicadora escindida (es decir, desialilada)) un sitio de unión para que las moléculas de unión produzcan una señal.

El soporte sólido puede comprender además una zona de control, corriente abajo de la zona de captura en relación con el flujo de la muestra, y la zona de aplicación de la muestra, si está presente, que contiene moléculas de unión adicionales, denominadas en la presente descripción “aglutinantes de detección de control” que se unen a las moléculas de unión para indicar la finalización satisfactoria de un ensayo con el dispositivo. Alternativamente, las moléculas de unión adicionales (aglutinantes de detección de control) pueden unirse a una molécula adicional, denominada en la presente descripción “moléculas de detección de control” añadidas a la muestra o al dispositivo y que fluye con la muestra a través del dispositivo. La molécula adicional (molécula de detección de control) puede marcarse, directa o indirectamente, con una molécula reportera como se define en la presente descripción. Preferentemente, la molécula reportera es la misma molécula reportera que se une a las moléculas de unión, para facilitar la detección, aunque puede ser diferente.

La zona de control está separada espacialmente de la zona de captura, por ejemplo para producir dos líneas de prueba separadas si el reportero se une o inmoviliza en cada zona respectiva. Esta zona de control se utiliza para confirmar que la muestra de prueba, que incluyen las moléculas de unión, ha pasado a través todo el dispositivo y confirma que el dispositivo está funcionando correctamente. Se espera una señal positiva en la zona de control independientemente de si hay actividad de sialidasa presente en la muestra o no. Las moléculas de unión adicionales se seleccionan basándose en la naturaleza de las moléculas de unión que se unen al sitio de escisión de las moléculas indicadoras o en la naturaleza de la molécula adicional añadida a la muestra. Las moléculas de unión y moléculas de unión adicionales o moléculas adicionales y moléculas de unión adicionales pueden formar un par de unión como se define en la presente descripción. Por ejemplo, si la molécula de unión es un anticuerpo específico de especie (por ejemplo, un anticuerpo de oveja), la molécula de unión adicional puede ser un anticuerpo anti-especie (por ejemplo, un anticuerpo anti-oveja). Por ejemplo, la molécula de detección de control puede ser un anticuerpo IgY de pollo y el aglutinante de detección de control puede ser un anticuerpo IgY anti-pollo, o *viceversa*. Alternativamente, si la molécula adicional es un anticuerpo de una especie diferente, por ejemplo, un pollo o una cabra, la molécula de unión adicional puede ser

un anticuerpo anti-especie apropiado. Esto permite la inmovilización de la molécula de unión o molécula adicional en la zona de control en virtud de una interacción específica. Las moléculas de unión adicionales pueden inmovilizarse en la zona de control por cualquier medio adecuado, por ejemplo mediante una interacción covalente o no covalente.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, la muestra de prueba puede ser una muestra vaginal, opcionalmente un hisopo vaginal. La muestra de prueba puede recolectarse por cualquier medio adecuado y presentarse en cualquier forma adecuada para su uso con la presente invención. Típicamente, la muestra se recolecta con un hisopo estéril. Además, como parte de la obtención de la muestra de prueba de su fuente original, la muestra puede someterse a una o más etapas de procesamiento o pretratamiento antes de realizar la prueba con el uso de la invención. En una modalidad, puede procesarse una muestra para producir una solución o suspensión para la prueba. Además, en ciertas modalidades, la muestra de prueba puede almacenarse, por ejemplo congelada a aproximadamente -20 °C, como un medio para conservar la muestra durante un período de tiempo dado antes de la prueba con el uso de la invención.

Se debe señalar que la invención se realiza típicamente *in vitro* basándose en muestras aisladas. Los métodos de la invención pueden incluir etapas para obtener una muestra para analizar en algunas modalidades, por ejemplo, con el uso de un hisopo estéril.

En vista de lo anterior, la invención puede definirse aún más mediante las siguientes cláusulas numeradas:

1. Un péptido que comprende la siguiente secuencia:



en donde:

- (i) Sial es un grupo sialilo;
 - (ii) X_3 es un aminoácido natural o no natural que comprende un grupo aceptor de glicosilo; y
 - (iii) X_1 , X_2 , X_4 y X_5 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido siempre que al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 sea un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un aminoácido no natural.
2. El péptido de la cláusula 1 en donde X_3 se selecciona de Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp, Asn, Arg o fosfoserina (SEP).
 3. El péptido de la cláusula 2 en donde X_3 es Ser.

4. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-3 en donde al menos dos, tres o los cuatro de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 son un D -aminoácido y/o un aminoácido no estándar o un no-aminoácido natural.
5. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-4 en donde X_1 , X_2 , X_4 y X_5 comprenden al menos dos, tres o cuatro aminoácidos diferentes.
6. El péptido de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-5, en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido hidrófobo.
7. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-6 en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es Ala.
8. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-7 en donde X_1 y X_2 son ambos Ala.
9. El péptido de la cláusula 7 u 8 en donde Ala es D Ala o β Ala.
10. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-9 en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido cargado.
11. El péptido de la cláusula 10 en donde cada aminoácido cargado se selecciona de Arg, D Asp y L Orn.
12. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-11 en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido polar.
13. El péptido de la cláusula 12 en donde cada aminoácido polar se selecciona de L Ser, D Ser y Thr.
14. Un péptido que comprende la siguiente secuencia:
 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}[\text{Gal-Sial}]-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$
en donde: Sial es un grupo sialilo; X_1 está ausente o es Thr; X_2 está ausente o es D Ala; X_3 está ausente o es Nle
 X_4 está ausente o es Glu; X_5 está ausente o es D Ala; X_6 está ausente o es Arg; X_7 está ausente o se selecciona de Glu, Arg, Ser, Nva, β Ala; X_8 está ausente o se selecciona de D Ser, D Ala, SEP, Cyc;
 X_9 está ausente o se selecciona entre Nva, BIP, D Ala, β Ala, Orn;
 X_{10} se selecciona de Cyc, Ser, Ile, D Ala, D Ser; X_{11} se selecciona de D Ala, Pro, Orn, Nle;
 X_{12} se selecciona de Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp, Asn, Arg o SEP;
 X_{13} se selecciona de D Ala, BIP, β Ala; X_{14} se selecciona de Arg, D Asp, Nle, Orn, Nva;
 X_{15} está ausente o se selecciona de Phe, BIP, Ser, Glu, D Ala, D Ser;
 X_{16} está ausente o se selecciona de D Ser, Glu;
 X_{17} está ausente o se selecciona de Val, Ser, Thr; X_{18} está ausente o es Cha;
 X_{19} está ausente o es D Ser; X_{20} está ausente o es Val.
15. El péptido de la cláusula 14 en donde X_{12} es Ser.

16. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-15 en donde el péptido comprende la siguiente secuencia:

- (i) Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg
- (ii) Glu-DSer-Nva-Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-Phe-DSer-Val
- (iii) Arg-DAla-BIP-Ser-Pro-Ser[Gal-Sial]-DAla-DAsp-Ser
- (iv) Ser-SEP-DAla-Ile-Orn-Ser[Gal-Sial]-DAla-Nle-Glu
- (v) DAla-Arg-Nva-DSer-βAla-DAla-Nle-Ser[Gal-Sial]-BIP-Orn-DAla-Glu-Ser; o
- (vi) Thr-DAla-Nle-Glu-DAla-Arg-βAla-Cyc-Orn-DSer-Pro-Ser[Gal-Sial]-βAla-Nva-DSer-Glu-Thr-Cha-DSer-Val

17. El péptido de cualquiera de las cláusulas 15 o 16 en donde Nle, Nva, Orn y/o Cha son _LNle, _LNva, _LOrn y _LCha respectivamente.

18. El péptido de cualquiera de las cláusulas 1-17 en donde el péptido está predispuesto para la escisión por una o más sialidasas específicas.

19. El péptido de acuerdo con la cláusula 18, en donde una o más sialidasas específicas son de origen bacteriano.

20. El péptido de acuerdo con la cláusula 19 en donde las bacterias son especies de *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Mobiluncus* y/o *Gardnerella vaginalis*.

21. Una molécula indicadora para usar en la detección de la presencia en una muestra de prueba de actividad de escisión de una enzima sialidasa, comprendiendo la molécula indicadora:

- a) un péptido como se define en cualquiera de las cláusulas 1-20; y
- b) un sitio de captura que permanece intacto después de la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por una enzima sialidasa presente en la muestra.

22. La molécula indicadora de la cláusula 21 en donde el sitio de captura comprende una molécula de biotina o una porción de oxima.

23. La molécula indicadora de la cláusula 21 o 22 en donde el sitio de captura está en el extremo N o C terminal del péptido.

24. La molécula indicadora de cualquiera de las cláusulas 21-23 en donde el sitio de captura está unido al péptido mediante un enlazador.

25. La molécula indicadora de acuerdo con la cláusula 24, en donde el enlazador comprende una porción de polietilenglicol (PEG).

26. La molécula indicadora de la cláusula 25 en donde el péptido está unido a un grupo biotina en su extremo N o C terminal a través de un enlazador que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en una porción de polietilenglicol.

27. La molécula indicadora de las cláusulas 21-26 en donde la molécula indicadora comprende la siguiente estructura:

- (i) Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-PEG-Biotina
- (ii) Biotina-PEG-Asp-Glu-DSer-Nva-Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-Phe-DSer-Val
- (iii) Biotina-PEG-Asp-Arg-DAla-BIP-Ser-Pro-Ser[Gal-Sial]-DAla-DAsp-Ser
- (iv) Biotina-PEG-Asp-Ser-Ser(PO₃)-DAla-Ile-Orn-Ser[Gal-Sial]-DAla-Nle-Glu
- (v) Biotina-PEG-Asp-DAla-Arg-Nva-DSer-βAla-DAla-Nle-Ser[Gal-Sial]-BIP-Orn-DAla-Glu-Ser; o
- (vi) Biotina-PEG-Asp-Thr-DAla-Nle-Glu-DAla-Arg-βAla-Cyc-Orn-DSer-Pro-Ser[Gal-Sial]-βAla-Nva-DSer-Glu-Thr-Cha-DSer-Val

28a. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente al derivado desialilado de un péptido de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-20 o una molécula indicadora de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 21-27, en donde el anticuerpo se une preferentemente al derivado desialilado sobre el péptido sialilado o la molécula indicadora.

28b. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada con 3 CDR y una cadena ligera con 3 CDR, en donde la CDR1 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 1; la CDR2 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 2; la CDR3 de cadena pesada tiene la SEQ ID NO: 3; la CDR1 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 4; la CDR2 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 5; y/o la CDR3 de cadena ligera tiene la SEQ ID NO: 6.

28c. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 7 y/o una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 8.

Cualquier referencia a la "cláusula 28" debe entenderse que abarca la cláusula 28a, la cláusula 28b, y la cláusula 28c.

29. El anticuerpo de la cláusula 28 en donde el anticuerpo puede unirse específicamente al epítipo:

Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Biotina, más particularmente el epítipo
Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg.

30. El anticuerpo de acuerdo con la cláusula 28 o 29, en donde el anticuerpo se conjuga con una molécula reportera.

31. El anticuerpo de acuerdo con la cláusula 30, en donde la molécula reportera es una partícula de oro.

32. Un péptido para usar en la generación de un anticuerpo de acuerdo con la cláusula 28, en donde el péptido es un derivado desialilado del péptido como se define en cualquiera de las cláusulas 1-20.

33. El péptido para usar de la cláusula 32, en donde el péptido se conjuga con una proteína transportadora para mejorar la inmunogenicidad.
34. El péptido para usar de la cláusula 33, en donde el péptido se conjuga con hemocianina de lapa californiana.
35. Un dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas para detectar la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, que comprende el dispositivo:
- (i) una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27;
 - (ii) una zona de captura para recibir la muestra de prueba, en donde la zona de captura comprende moléculas de captura capaces de unirse al sitio de captura de la molécula indicadora, independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido o no, para inmovilizar la molécula indicadora; y
 - (iii) moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra.
36. El dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con la cláusula 35 en donde el dispositivo, kit o composición de materia comprende un soporte sólido al que se unen las moléculas de captura para formar la zona de captura.
37. El dispositivo de detección de enzimas, el kit de detección de enzimas o la composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con la cláusula 36, en donde el soporte sólido comprende además una zona de aplicación de la muestra a la que se aplica la muestra.
38. El dispositivo de detección de enzimas, el kit de detección de enzimas o la composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36-37, en donde el soporte sólido comprende además una zona de control, corriente abajo de la zona de captura en relación con la zona de aplicación de la muestra, que contiene más moléculas de unión que se unen a las moléculas de unión para indicar la finalización satisfactoria de un ensayo con el uso del dispositivo, kit o composición de materia.
39. El dispositivo de detección de enzimas, el kit de detección de enzimas o la composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36-38 en donde el soporte sólido comprende un medio cromatográfico.

40. El dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 35-39 en donde la molécula indicadora se inmoviliza en la zona de captura a través del sitio de captura que se une a las moléculas de captura.

41. Un método para detectar la presencia o ausencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, el método comprende:

(i) poner en contacto una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27 con la muestra de prueba;

(ii) añadir a la muestra de ensayo moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) capturar el derivado desialilado de la molécula indicadora en una zona de captura mediante la unión de moléculas de captura en la zona de captura al sitio de captura, dichas moléculas de captura pueden unirse al sitio de captura independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido; y

(iv) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura.

42. Un método para detectar la presencia o ausencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, el método comprende:

(i) añadir la muestra de prueba a una zona de captura que comprende moléculas de captura, dichas moléculas de captura están unidas al sitio de captura de una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27 en donde dichas moléculas de captura permanecen unidas al sitio de captura independientemente de si ocurre o no la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(ii) añadir moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura.

43. El método de la cláusula 42 en donde, antes de la etapa (i), la molécula indicadora se añade a la zona de captura de manera que la molécula indicadora se une en la zona de captura a través de las moléculas de captura.

44. Un método para diagnosticar la vaginosis bacteriana en una muestra de prueba mediante la detección de la actividad de escisión de una enzima sialidasa en la muestra, el método comprende:

(i) poner en contacto una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27 con la muestra de prueba;

(ii) añadir a la muestra de ensayo moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) capturar el derivado desialilado de la molécula indicadora en una zona de captura mediante la unión de moléculas de captura en la zona de captura al sitio de captura, dichas moléculas de captura pueden unirse al sitio de captura independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido; y

(iv) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la determinación de la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada en la zona de captura en donde un mayor nivel de escisión en comparación con un control diagnostica la vaginosis bacteriana.

45. Un método para diagnosticar la vaginosis bacteriana en una muestra de prueba mediante la detección de la actividad de escisión de una enzima sialidasa en la muestra, el método comprende:

(i) añadir la muestra de prueba a una zona de captura que comprende moléculas de captura, dichas moléculas de captura están unidas al sitio de captura de una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27 en donde dichas moléculas de captura permanecen unidas al sitio de captura independientemente de si ocurre o no la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(ii) añadir moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra;

(iii) detectar la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora determinando la unión de las moléculas de unión al derivado desialilado de la molécula indicadora capturada

en la zona de captura en la que un mayor nivel de escisión en comparación con un control diagnostica la vaginosis bacteriana.

46. El método de la cláusula 45 en donde, antes de la etapa (i), la molécula indicadora se añade a la zona de captura de manera que la molécula indicadora se une en la zona de captura mediante las moléculas de captura.

47. El método de cualquiera de las cláusulas 41-46, en donde la enzima sialidasa se origina de las especies *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Mobiluncus* y/o *Gardnerella vaginalis*.

48. El método de cualquiera de las cláusulas 41-47 en donde el método se realiza con el uso de un dispositivo, kit o composición de materia como se reivindica en cualquiera de las cláusulas 35-40.

49. El método de cualquiera de las cláusulas 41, 44 o 47 en donde el método se realiza con el uso de un dispositivo, kit o composición de materia como se reivindica en cualquiera de las cláusulas 35-39, además en donde la muestra de prueba y la molécula indicadora se mezclan antes de llevar la muestra de prueba en contacto con el dispositivo, kit o composición de materia.

50. Un kit de detección de enzimas para detectar la presencia en una muestra de prueba de actividad de escisión de una enzima sialidasa, el kit comprende:

(i) una molécula indicadora como se define en cualquiera de las cláusulas 21-27 para añadir a la muestra de prueba;

(ii) moléculas de captura capaces de unirse al sitio de captura de la molécula indicadora, independientemente de si la molécula indicadora se ha escindido o no;

(iii) un soporte sólido al que pueden unirse las moléculas de captura para formar una zona de captura para recibir la muestra de prueba; y

(iv) moléculas de unión capaces de unirse al derivado desialilado de la molécula indicadora, en donde las moléculas de unión son incapaces de unirse a la molécula indicadora a menos que y hasta que ha ocurrido la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra.

51. El kit de detección de enzimas de la cláusula 50, en donde el kit comprende además moléculas de unión adicionales (aglutinantes de detección de control) capaces de unirse a las moléculas de unión.

52. El kit de detección de enzimas de acuerdo con la cláusula 51 en donde el soporte sólido comprende además una zona de control, corriente abajo de la zona de captura en relación con la zona de aplicación de la muestra, a la que pueden unirse las moléculas de unión adicionales (aglutinantes de detección de control).

53. El dispositivo de detección de enzimas, el kit de detección de enzimas o la composición de materia de detección de enzimas de cualquiera de las cláusulas 35-40, el método de cualquiera de las cláusulas 41-49 o el kit de detección de enzimas de cualquiera de las cláusulas 50-52 en donde la molécula de unión comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las cláusulas 28-31.

54. El dispositivo de detección de enzimas, el kit de detección de enzimas o la composición de materia de detección de enzimas de cualquiera de las cláusulas 35-40 o 53, el método de cualquiera de las cláusulas 41-49 o 53 o el kit de detección de enzimas de cualquiera de las cláusulas 50-53 en donde el sitio de captura comprende una molécula de biotina y la zona de captura comprende una molécula de estreptavidina.

55. Uso de un dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 35-40 53 o 54, método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 41-49, 53 o 54 o el kit de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50-54 para diagnosticar la vaginosis bacteriana en una muestra de prueba.

56. La molécula indicadora de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 21-27, dispositivo de detección de enzimas, kit de detección de enzimas o composición de materia de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 35-40, 53 o 54, método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 41-49, 53 o 54, el kit de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50-54 o el uso de la cláusula 55, en donde la muestra de prueba es una muestra vaginal, opcionalmente un hisopo vaginal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo con respecto a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una vista esquemática de un formato del ensayo de acuerdo con la invención. El formato se basa en los siguientes componentes básicos: un soporte sólido (1); una molécula de captura (2); una molécula indicadora que comprende un sitio de captura (3) y un péptido de la invención, que comprende el péptido un sitio de escisión Gal-Sial (4); y una molécula de unión (5) que se une a la molécula indicadora solo después de ha ocurrido la escisión (6). La molécula indicadora Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-PEG-Biotina (SEQ ID NO: 11-PEG-Biotina; también denominado "MOL600c" en la presente descripción) se muestra a modo de ejemplo.

La Figura 2 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con la presente invención y muestra el funcionamiento del dispositivo en ausencia (Figura 2A) o presencia (Figura 2B) de actividad sialidasa.

La Figura 3 muestra la lectura visual del ensayo (que se muestra en la Figura 2) a medida que aumentan los niveles de actividad de sialidasa en la muestra de prueba.

La Figura 4 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con la presente invención. La Figura especifica las dimensiones longitudinales exactas y la posición de cada uno de los componentes de la tarjeta.

La Figura 5 es una vista esquemática de las dos químicas de conjugación usadas para acoplar péptidos de la invención a hemocianina de lapa californiana (KLH): (A) acoplamiento cisteína/maleimida; (B) acoplamiento hidracina/benzaldehído.

La Figura 6 muestra algunos de los aminoácidos no estándar y no naturales empleados durante el diseño de los péptidos de la invención.

La Figura 7 es una vista esquemática que resume el enfoque sintético usado para producir péptidos de la invención.

La Figura 8 muestra la producción de un péptido sialilado de la invención con el uso de una ruta enzimática con el uso transialidasa y fetuina (un donante de ácido siálico).

La Figura 9 muestra varios péptidos y conjugados péptido-proteína sintetizados como parte de la invención. (A) Resumen tabular de los péptidos y conjugados péptido-proteína sintetizados. (B) Descripción esquemática de los péptidos y los conjugados péptido-proteína sintetizados.

La Figura 10 muestra los resultados iniciales del ELISA después de la inmunización de ovejas con conjugados de KLH-péptido de la invención. (A) un esquema del método de detección; (B)-(D) los resultados de los primeros sangrados, lo que indica que todas las ovejas respondieron a las inmunizaciones. Los números 1056, 1057, 1058, 1059, 1062, 1063, 1064, 1065, 1066 y 1067 designan antisueros de una oveja inmunizada específica, respectivamente.

La Figura 11A-C muestra los resultados del ELISA de un segundo sangrado de la oveja descrita en la Figura 10. Los antisueros mostraron un aumento en la respuesta en los segundos sangrados en comparación con los primeros sangrados

La Figura 12A-B muestra los tres sangrados comparados para la oveja CF1062-1067.

La Figura 13 muestra los resultados del ELISA cuando se evaluó el antisero CF1064 frente a MOL136 y MOL136c. (A) un esquema del método de detección; (B)

resultados del ELISA que muestran una especificidad significativa para el péptido galactosilo (es decir, desialilado) MOL136 con preferencia al péptido sialilado MOL136c.

La Figura 14 muestra la detección del péptido desialilado MOL136 con el uso de CF1064 marcado con oro mediante un ensayo de flujo lateral con poca/ninguna señal observada en relación con el péptido sialilado MOL136c ni con el control negativo (en donde no se incluyó ningún péptido en la muestra).

La Figura 15 muestra la detección del péptido desialilado MOL136 con el uso de CF1064 y CF1065 marcados con oro mediante un ensayo de flujo lateral con poca/ninguna señal observada en relación con el péptido sialilado MOL136c ni el control negativo (en donde no se incluyó ningún péptido en la muestra).

La Figura 16 muestra un ensayo de flujo lateral que compara la unión de MOL136 y MOL136c de CF1064 marcado con oro en presencia de extractos de torunda vaginal sanos.

La Figura 17 muestra un ensayo de flujo lateral de MOL136c en presencia de 25 U/ml de sialidasa.

La Figura 18 muestra datos de flujo lateral que muestran una comparación entre diferentes fracciones de antisueros purificados por afinidad. (A) Representación gráfica de las intensidades de las líneas; (B) tiras de prueba de flujo lateral como se observa: (1) -anticuerpo policlonal purificado por afinidad sensibilizado con oro, (2) -anticuerpo policlonal purificado por afinidad sensibilizado con oro con anticuerpos de reactividad cruzada eliminados, (3) anticuerpos de reactividad cruzada sensibilizados con oro de la purificación por afinidad.

La Figura 19 muestra (A) una comparación de la unión de MOL136, MOL136c, MOL600 y MOL600c por ELISA y (B) experimentos de flujo lateral que muestran una mejora marcada del rendimiento en comparación con MOL136/136c (referirse a la Figura 18).

La Figura 20 muestra los datos de estabilidad para MOL600c secado con calor en tubos de polipropileno a diferentes temperaturas de almacenamiento y con dos métodos de secado con calor diferentes: un método de vacío rápido y un método de bloque de calor. Las medidas en ELISA se normalizan al porcentaje de desialilación ya que esto resultaría en el reconocimiento por parte del anticuerpo y un aumento de la señal.

La Figura 21 muestra datos típicos para lotes MOL600c. (A) una traza de HPLC analítica; (B) confirmación de MS por electropulverización de iones positivos.

La Figura 22 es un esquema que muestra los métodos de columna usados para la purificación de anticuerpos con diferentes matrices de sefarosa. Las etiquetas

naranjas que se muestran con respecto a MOL600 y MPL600c representan biotina. La etiqueta violeta que se muestra con respecto a MOL615 representa un grupo oxima.

La Figura 23 muestra los datos de estabilidad de los casetes de flujo lateral almacenados durante 12 semanas a 37 °C.

La Figura 24 muestra una curva estándar de flujo lateral de concentración de sialidasa incubada durante 5 minutos con el péptido MOL600c. Las líneas de prueba se cuantificaron con el uso de Cube Reader.

La Figura 25 muestra la prueba de flujo lateral de una muestra vaginal de voluntario sano en un hisopo flocado. La muestra se extrajo en 1 ml de tampón de muestra y se dividió en cinco formas. (A) muestra pero sin péptido; (B) muestra con MOL600c; (C) muestra con MOL600c y sialidasa a 500 U/ml durante 5 minutos; (D) muestra con MOL600c centrifugado; (E) muestra con MOL600c y la misma incubación con sialidasa centrifugada.

La Figura 26 muestra la fórmula química de MOL616.

La Figura 27 muestra los resultados del Ejemplo 13 que muestran la especificidad del anticuerpo 125,1 para MOL600 en comparación con la forma sialilada, MOL600c.

La Figura 28 muestra una comparación de los ensayos A y B con el uso de un intervalo de diferentes concentraciones de sialidasa. Para cada concentración de sialidasa, la barra izquierda representa la lectura del cubo para el ensayo B y la barra de la derecha representa la lectura del cubo para el ensayo A.

La Figura 29 muestra una comparación de los ensayos A y B con el uso de un intervalo de diferentes concentraciones de sialidasa y tiempos de lectura. Para cada concentración de sialidasa, la barra representa de izquierda a derecha (i) la lectura del cubo para el ensayo A después de un tiempo de lectura de 5 minutos; (ii) la lectura del cubo para el ensayo A después de un tiempo de lectura de 10 minutos; (iii) la lectura del cubo para el ensayo B después de un tiempo de lectura de 5 minutos; y (iv) la lectura del cubo para el ensayo B después de un tiempo de lectura de 10 minutos.

La Figura 30 muestra una comparación de los ensayos A, A', B y B' con el uso de un intervalo de diferentes concentraciones de sialidasa, concentraciones de indicador y tiempos de lectura. . Para cada concentración de sialidasa, la barra representa de izquierda a derecha (i) la lectura del cubo para el ensayo B con 1 µg/ml de molécula indicadora por disco y 5 minutos de tiempo de lectura; (ii) la lectura del cubo para el ensayo B con 3 µg/ml de molécula indicadora por disco y 5 minutos de tiempo de lectura; (iii) la lectura del cubo para el ensayo A con 1 µg/ml de molécula indicadora por disco y

10 minutos de tiempo de lectura; y (iv) la lectura del cubo para el ensayo A con 3 µg/ml de molécula indicadora por disco y 10 minutos de tiempo de lectura.

La Figura 31 muestra las secuencias del anticuerpo 125,1 que indican la CDR y las regiones marco.

DESCRIPCIÓN DE MODALIDADES PREFERIDAS

La Figura 1 es una vista esquemática de un formato del ensayo de acuerdo con la invención. El formato se basa en los siguientes componentes básicos: un soporte sólido (1); una molécula de captura (2); una molécula indicadora que comprende un sitio de captura (3) y un péptido de la invención, que comprende el péptido un sitio de escisión Gal-Sial (4); y una molécula de unión (5) que se une a la molécula indicadora solo después de ha ocurrido la escisión (6). La molécula indicadora Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-PEG-Biotina (también denominada “MOL600c” en la presente descripción) se muestra a modo de ejemplo.

En el formato que se muestra, la molécula de captura (2) es estreptavidina. Aquí, la molécula de captura (2) se une a un sitio de captura de biotina (3) dentro de la molécula indicadora.

Como se muestra en la Figura 1A, una vez que la molécula indicadora de la invención se añade a una muestra de prueba, la enzima sialidasa presente en la muestra reconoce específicamente el sitio de escisión Gal-Sial (4) y escinde el grupo sialilo de la molécula indicadora (6).

Como se muestra en la Figura 1B, este evento de escisión (6) produce un sitio de unión para la molécula de unión del anticuerpo específico (5). La molécula de unión (5) es incapaz de unirse a la molécula indicadora hasta que ha ocurrido la escisión (6). Por tanto, la molécula de unión del anticuerpo (5) se une a la secuencia de aminoácidos Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg producido como un resultado de la escisión del grupo sialilo. La molécula de unión del anticuerpo (5) no se une a la secuencia Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg antes de la escisión (no se muestra).

La Figura 2 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con la presente invención y muestra el funcionamiento del dispositivo en ausencia (Figura 2A) o presencia (Figura 2B) de actividad sialidasa. La tira reactiva incluye un revestimiento adhesivo (1) sobre el que se ensamblan los demás componentes del dispositivo. De derecha a izquierda, la zona de aplicación de la muestra (2) está en forma de almohadilla absorbente. Esta se coloca superponiendo parcialmente la almohadilla de conjugado (3), que se impregna con las moléculas de

unión marcadas (7). En modalidades alternativas, las moléculas de unión marcadas pueden impregnarse en la zona de aplicación de la muestra y esto elimina la necesidad de una almohadilla de conjugado separada. La almohadilla de conjugado (3) está en conexión fluida con una membrana de nitrocelulosa (4). La membrana de nitrocelulosa (4) contiene moléculas de estreptavidina inmovilizadas (5) que definen una zona de captura. La membrana (4) contiene además moléculas de unión adicionales inmovilizadas (6) corriente abajo de la zona de captura que se unen a otras moléculas marcadas (11) que pasan a través del dispositivo con la muestra y forman una zona de control separada. Alternativamente, las moléculas de unión adicionales inmovilizadas pueden unirse a moléculas de unión marcadas (7). El dispositivo opcionalmente comprende además una almohadilla absorbente (8) para absorber cualquier muestra de prueba y reactivos que lleguen al extremo del dispositivo.

En uso, la molécula indicadora (9) se añade a la muestra de prueba antes de poner la muestra de prueba en contacto con la zona de aplicación de la muestra (8) del dispositivo. Como se muestra en la Figura 2A, en ausencia de actividad de sialidasa en la muestra de prueba, el grupo sialilo no se escinde de la molécula indicadora (9). Tras el flujo de la muestra en la almohadilla de conjugado (3), las moléculas de unión (7) no pueden unirse a la molécula indicadora (9) porque no ha ocurrido la escisión del grupo sialilo. Las moléculas indicadoras se unen en la zona de captura mediante la interacción entre la estreptavidina (5) y el sitio de captura de biotina (10) de la molécula indicadora (9). Las moléculas de unión marcadas (7) no se inmovilizan en la zona de captura porque no pueden unirse a las moléculas indicadoras (9). En consecuencia, las moléculas de unión marcadas fluyen a través de la zona de control y más allá. Otras moléculas marcadas (11) también pasan a través del dispositivo a la zona de control donde se inmovilizan uniéndose a las moléculas de unión adicionales inmovilizadas (6). Por tanto, la ausencia de actividad de sialidasa se muestra como una señal solo en la zona de control, pero no en la zona de captura. El exceso de muestra, que potencialmente contiene moléculas de unión marcadas (7), fluye hacia la almohadilla absorbente (8).

Como se muestra en la Figura 2B, en presencia de actividad sialidasa en la muestra de prueba, el grupo sialilo se escinde de la molécula indicadora (9). Tras el flujo de la muestra en la almohadilla de conjugado (3), las moléculas de unión (7) pueden unirse a la molécula indicadora (9) porque ha ocurrido la escisión del grupo sialilo. Las moléculas indicadoras se unen en la zona de captura mediante la interacción entre la estreptavidina (5) y el sitio de captura de biotina (10) de la molécula indicadora (9). Las moléculas de unión marcadas (7) se inmovilizan en la zona de captura debido a la unión

a las moléculas indicadoras desialiladas (9) en el sitio de escisión. Debido al exceso relativo de molécula de unión marcada (7) a los sitios de unión en la zona de captura, algunas moléculas de unión marcadas (7) aún fluyen a través de la zona de control y más allá. Otras moléculas marcadas (11) también pasan a través del dispositivo a la zona de control donde se inmovilizan uniéndose a las moléculas de unión adicionales inmovilizadas (6). Por tanto, la presencia de actividad de sialidasa se muestra como una señal tanto en la zona de captura como en la zona de control. El exceso de muestra fluye hacia la almohadilla absorbente (8).

Cabe señalar que la zona de control es opcional. La presencia o ausencia de actividad de sialidasa en la muestra puede monitorizarse basándose únicamente en la presencia o ausencia de una señal correspondiente en la zona de captura.

La Figura 3 muestra la lectura visual del ensayo (que se muestra en la Figura 2) a medida que aumentan los niveles de actividad de sialidasa en la muestra de prueba. Como puede verse fácilmente, la señal en la zona de control (1) es constante a medida que aumentan las cantidades de sialidasa. Por el contrario, a medida que aumentan las cantidades de sialidasa, también aumenta la señal en la zona de captura (2). Esto se debe a la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora en el sitio de escisión por la actividad de la sialidasa. Esto revela un sitio de unión, que permite la unión de las moléculas de unión que se detecta en la zona de captura (2) a través de la interacción entre las moléculas de captura que definen la zona de captura y el sitio de captura de las moléculas indicadoras.

La Figura 4 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas específico de acuerdo con la presente invención. La tabla a continuación proporciona una leyenda para la figura y especifica las dimensiones longitudinales exactas y la posición de cada uno de los componentes de la tarjeta en esta modalidad particular. Por supuesto, las dimensiones y posiciones pueden variarse, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica.

Componente	Talla	Posición desde el punto de referencia
Tarjeta de respaldo (1)	60 mm	0 mm
Membrana de nitrocelulosa (2)	25 mm	20 mm
Almohadilla de conjugado (3)	17 mm	5 mm
Almohadilla de muestra (4)	10 mm	0 mm
Almohadilla absorbente (5)	22 mm	38 mm

La invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Principio de química de ensayo y diseño experimental

En resumen, el principio funciona sobre la base del reconocimiento del anticuerpo del producto químico de la reacción de la sialidasa, donde el sustrato químico es un péptido diseñado específicamente para reaccionar con la sialidasa y el producto de la reacción se reconoce después por el anticuerpo generado contra ese producto sintético. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, se proporciona un glicopéptido que contiene ácido siálico y con una etiqueta de biotina. Cuando se pone en contacto con una muestra de prueba que contiene actividad sialidasa, el grupo sialilo se escinde del glicopéptido por la sialidasa para exponer el grupo galactosilo colgante en el péptido. Un anticuerpo generado contra el producto desialilado se une luego específicamente al producto escindido. Con el uso de un conjugado de anticuerpo-oro y una tira de flujo lateral con una línea de prueba de estreptavidina, la presencia del producto desialilado puede detectarse como una línea roja y una medida directa de la actividad de la sialidasa en una muestra.

Se diseñaron originalmente cinco péptidos y los anticuerpos subsiguientes generados se evaluaron y perfilaron en cuanto a su rendimiento en un ensayo de flujo lateral. Se demostró que, en condiciones optimizadas, algunos de los anticuerpos superaron a otros en términos de su reactividad cruzada con el péptido sustrato y sus niveles generales de señal en el ensayo. En las evaluaciones que se describen a continuación para la fase de viabilidad del proyecto, los péptidos se reevaluaron y la combinación de péptido/anticuerpo con el mejor rendimiento se llevó adelante para un desarrollo posterior.

Ejemplo 2: Diseño de péptidos

En el diseño de las secuencias de péptidos candidatos se tuvieron en cuenta varios factores:

Talla

Como regla general, es poco probable que las moléculas con un peso molecular (MW) menor que 5000 daltons estimulen una buena respuesta inmune en un organismo huésped. Los péptidos se planearon como secuencias relativamente cortas con la intención de conjugarse con KLH (hemocianina de lapa californiana), lo que resulta en un inmunógeno mucho más eficaz. Se propuso un intervalo de diferentes longitudes (9-20 aminoácidos) para cubrir cualquier variación potencial en el rendimiento.

Química de conjugación

Se usaron dos químicas de conjugación diferentes. Para dos de los péptidos, se incorporó un marcador de cisteína en la estructura de modo que pudiera conjugarse con proteínas transportadoras con el uso de una química estándar basada en maleimida. Para los otros tres péptidos se usó una química basada en hidrazina relativamente nueva, que es un proceso más controlable que la química de la cisteína, ya que existe menos riesgo de oxidación del péptido antes del acoplamiento y el grado de acoplamiento puede controlarse fácilmente mediante absorbancia UV. En la Figura 5 se muestra una descripción general de estas químicas de conjugación.

Posición del azúcar galactosa

El objetivo fue obtener anticuerpos con una afinidad muy alta por el azúcar galactosa y las regiones circundantes del péptido. Teniendo esto en cuenta, se decidió colocar el azúcar en el centro de la estructura para que estuviera bien flanqueado por otras características peptídicas distintivas. Se espera que este enfoque minimice los anticuerpos de unión periférica que carezcan de interacción con la porción de azúcar.

Diversidad estructural

Se usó una gama de aminoácidos para construir las varias secuencias de péptidos. Combinando grupos cargados, hidrófilos e hidrófobos a lo largo de la secuencia se promoverían diversas topologías. También se emplearon “grupos de bisagra” tales como la β -alanina para permitir grados adicionales de libertad en el pliegue estructural general. Además de esto, se emplearon aminoácidos no naturales para aumentar la diversidad de secuencias y promover una respuesta inmune. Para reducir la susceptibilidad a las proteasas también se incorporaron algunos D-aminoácidos. Algunos de los aminoácidos no estándar y no naturales empleados se muestran en la Figura 6.

Después de la consideración de estos factores, se eligieron las siguientes secuencias de péptidos como epítomos putativos.

Secuencia de péptidos	Nombre designado
---Arg-DAla-Bip-Ser-Pro-Ser(β -Gal)-DAla-DAsp-Ser----	MOL133 (SEQ ID NO: 13 desialilado)
---Ser-SEP-DAla-Ile-Orn-Ser(β -Gal)-DAla-Nle-Glu----	MOL134 (SEQ ID NO: 14 desialilado)
---DAla-Arg-Nva-DSer- β Ala-DAla-Nle-Ser(β -Gal)-Bip-Orn-DAla-Glu-Ser----	MOL135 (SEQ ID NO: 15 desialilado)
---Glu-DSer-Nva-Cyc-DAla-Ser(β -Gal)-DAla-Arg-Phe-DSer-Val---	MOL136 (SEQ ID NO: 12 desialilado)
---Thr-DAla-Nle-Glu-DAla-Arg- β Ala-Cyc-Orn-DSer-Pro-Ser(β -Gal)- β Ala-Nva-DSer-Glu-Thr-Cha-DSer-Val----	MOL137 (SEQ ID NO: 16 desialilado)

Se añadieron espaciadores, grupos de conjugación y marcadores de biotina a los extremos C o N.

Ejemplo 3: Síntesis de péptidos

Los péptidos marcados con galactosa se sintetizaron con el uso de métodos de química en fase sólida en un sintetizador de microondas automático. Todos los péptidos se purificaron con el uso de HPLC de fase inversa y se caracterizaron por LCMS por electropulverización. Para marcar la porción de galactosa con ácido siálico se empleó una ruta enzimática con el uso de transialidasa recombinante de *T. cruzi* (TcTS) y fetuina como donante de ácido siálico. Las Figuras 7 y 8 resumen el enfoque sintético usado.

Además de los inmunógenos peptídicos relevantes para la conjugación con proteínas transportadoras, también se sintetizaron dos derivados biotinilados de cada secuencia, uno marcado con ácido siálico. Estos derivados biotinilados formarían la base para el formato de ensayo de flujo lateral. La Figura 9 muestra los péptidos sintetizados para este trabajo de acuerdo con las distintas inmunizaciones. Los péptidos marcados con ácido siálico se designan con una 'c'; por ejemplo, MOL136c. Los

péptidos que carecen del grupo sialilo carecen de esta designación (por ejemplo, MOL136).

Ejemplo 4A: Generación de anticuerpos

Inmunizaciones

Los cinco inmunógenos peptídicos se acoplaron a KLH y BSA con el uso de las químicas de acoplamiento apropiadas (ver Figura 9). Los conjugados de KLH se enviaron a Micropharm Ltd para su inmunización en diez ovejas (dos por péptido). El programa se inició con una dosis de 1 mg de péptido KLH en PBS. Se administraron tres refuerzos adicionales de 0,5 mg durante un período de tres meses. Se tomaron tres sangrados separados durante este período (una muestra y dos sangrados de producción) y se suministraron a Mologic. Los conjugados de BSA se conservaron para realizar el tamizaje de los varios sangrados.

Pantallas de ELISA iniciales

Se sensibilizaron placas de poliestireno de alta unión de múltiples pocillos con el conjugado de BSA apropiado y BSA no conjugado como control. Las muestras de suero se incubaron en los pocillos bloqueados con BSA a varias diluciones y se unieron adicionalmente con un anticuerpo secundario anti oveja conjugado con fosfatasa alcalina (AP). Las incubaciones con el sustrato AP de paranitrofenilfosfato (pNPP) indicaron la presencia de cualquier unión. En todos los casos, los controles de tampón, BSA y previo al sangrado no resultaron en una unión de fondo a la placa. La Figura 10A muestra un esquema del método de detección. Las Figuras 10B-10D muestran los resultados de los primeros sangrados, lo que indica que todas las ovejas respondieron a las inmunizaciones. Las diluciones de sueros a 1/1000 dieron una señal alta mientras que los controles de BSA fueron negativos, lo que confirma la respuesta específica del péptido. Los controles previos al sangrado también fueron negativos.

A medida que se dispuso de más sangrados, también se analizaron mediante ELISA, que mostró una mejora de la respuesta con el tiempo. La Figura 11 ilustra la relación entre los dos primeros sangrados para todas las ovejas, mientras que la Figura 12 muestra los tres sangrados en comparación con la oveja CF1062-1067. Curiosamente, los terceros sangrados parecen estancados o incluso reducidos en términos de su respuesta general al antígeno. No obstante, en algunos casos se detectó una respuesta de unión a una dilución de 1/1000000, lo que sugiere una respuesta policlonal altamente sensible al péptido. A pesar de la respuesta ligeramente inferior en los terceros sangrados, se prefirieron para las purificaciones por afinidad, ya que fueron los más probables de contener una subpoblación de anticuerpos altamente específicos.

Ejemplo 4B: Antisueros CF1064 y CF1065 y detección de MOL136 y MOL136c

Inmunógeno: KLH-MOL123A

Péptidos biotinilados: MOL136 (galactosilo); MOL136c (sialilo)

Ambas ovejas respondieron bien a la inmunización con KLH-MOL123A con CF1064 dando una respuesta global ligeramente más fuerte (ver Figura 11B). En formato ELISA (un esquema del cual se muestra en la Figura 13A), se evaluó la unión de CF1064 frente a MOL136 y MOL136c, lo que muestra una especificidad significativa para el péptido galactosilo (es decir, desialilado) MOL136 con preferencia al péptido sialilado MOL136c (Figura 13B). Por tanto, se demuestra una excelente discriminación de los dos péptidos por el antisuero CF1064.

Se observaron propiedades similares en formato de flujo lateral. CF1064 se conjugó con partículas de oro en condiciones optimizadas (carga de 15 µg/ml en tampón de borato de sodio 10 mM; pH 8,0) y se ensayó contra MOL136 y MOL136c a una concentración final de 1,3 ng/ml (38 pg por tira). Por tanto, se formó primero una zona de captura en cada tira de prueba de flujo lateral con el uso de 1,5 mg/ml de estreptavidina. Luego, se mezclaron 3 µl de cada péptido (12,5 ng/ml de péptido en PBST) con 10 µl de CF1064 marcado con oro y 15 µl de tampón de corrida (Tris 0,5 M a pH 7,5 + BSA al 3 % + Tritón X-100 al 0,5 %) antes de pasar cada muestra a lo largo de una tira de prueba de flujo lateral separada. También se usó un control negativo en donde no se añadió péptido como control negativo. A continuación, se pasaron 15 µl de lavado con tampón continuo a lo largo de cada tira de prueba de flujo lateral. El péptido desialilado MOL136 se detectó claramente en la zona de captura, observado como una línea visible en la tira de prueba. Por el contrario, se observó poca/ninguna señal en relación con el péptido sialilado MOL136c ni con el control negativo (ver Figura 14).

Se observaron resultados similares con el uso de CF1065 marcado con oro, con un nivel de señal más alto observado para CF1065 en relación con CF1064 (ver la Figura 15).

Ejemplo 5: Detección de MOL136 y MOL136c con el uso de CF1064 en presencia de extractos en hisopo vaginal de sanos

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 4B en presencia de extractos en hisopo vaginal de sanos. Aunque los niveles de señal fueron ligeramente más bajos, la especificidad de MOL136 se mantuvo sin ninguna interferencia de la matriz del hisopo (ver la Figura 16).

Ejemplo 6: Detección de actividad de sialidasa con el uso de MOL136c y CF1064

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 4B en presencia de sialidasa 25 U/ml. Se usó como control negativo una muestra en donde no había sialidasa. Se corrió un control negativo adicional en donde no se incluyó péptido ni sialidasa en la muestra. Como control positivo, se usó MOL136 en lugar de MOL136c en presencia de sialidasa 25 U/ml. Se observó una clara señal positiva con respecto a MOL136c incubado en presencia de sialidasa 25 U/ml en PBST durante 5 minutos. El nivel de señal fue similar en intensidad al del control positivo que muestra la señal máxima putativa. Como era de esperar, se observó poca o ninguna señal con respecto a los controles negativos (ver Figura 17).

En general, tanto CF1064 como CF1065 mostraron una buena especificidad por el péptido galactosilo (es decir, desialilado) MOL136 y ambos son candidatos potenciales para el tamizaje monoclonal.

Ejemplo 7: Desarrollo de péptidos

Después de una evaluación de los péptidos y antisueros, se demostró que los sueros CF1064 y los péptidos MOL136 y MOL136c proporcionaron la combinación más factible para la prueba. CF1064 de oveja se inmunizó con la misma secuencia de péptidos que MOL136 pero como un conjugado de KLH con el uso de la química de cisteína-maleimida en lugar de la biotina.

MOL136: biotina-PEG-Asp-Glu-D-Ser-Nva -Cyc-D-Ala-Ser[Gal]-D-Ala-Arg-Phe-D-Ser-Val-OH

MOL136c: biotina-PEG-Asp-Glu-D-Ser-Nva-Cyc-D-Ala-Ser[Gal-Sial]-D-Ala-Arg-Phe-D-Ser-Val-OH

Para purificar los antisueros, se ideó un método con el uso de una columna de estreptavidina para capturar MOL136 y MOL136c. Luego, el anticuerpo se unió y se eluyó de la columna MOL136 y se absorbió en la columna MOL136c para eliminar cualquier aglutinante periférico que recogiera epítomos comunes entre las dos estructuras. Evaluando el anticuerpo purificado en flujo lateral, se midió la especificidad global del antígeno péptido galactosilo original y el grado de reactividad cruzada con el péptido sialilado (Figura 18). Esto es importante porque representa la cantidad de unión no específica observada en un resultado negativo en el prototipo y, sin un lector óptico en uso, debería reducirse significativamente para que a simple vista no lo detecte.

La fracción purificada y absorbida se comportó mejor en el ensayo en comparación con los materiales no absorbidos. A pesar de la señal de fondo significativamente más baja, se requirió desarrollo del método adicional para mejorar el rendimiento truncando la estructura del péptido.

Para refinar el diseño del péptido y eliminar las interacciones periféricas de los anticuerpos que no se unen a la porción de galactosa en el péptido, la secuencia original MOL136 se truncó a una secuencia más corta MOL600:

MOL600: NH₂-Cyc -DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Biotina

MOL600c: NH₂-Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-PEG-Biotina

Luego, se analizaron MOL600 y MOL600c mediante ELISA y lateral mostrando una mejora significativa en el rendimiento (ver Figura 19).

Ejemplo 8: Estudios de formulación/estabilidad de MOL600c y producción a gran escala

Para evaluar cómo se podría formular el péptido MOL600c, se organizó un estudio para observar las condiciones de secado. El péptido se formuló en un tampón de secado, se secó al aire y se almacenó a temperatura ambiente antes de su uso en el formato prototipo. Los datos se muestran en la Figura 20 que demuestran la estabilidad del péptido MOL600c almacenado en tubos de polipropileno a diferentes temperaturas y con diferentes métodos de secado. Los péptidos conservaron su funcionalidad hasta la semana 4 en general, sin embargo, el rendimiento parece disminuir a las 8 semanas.

Para la fabricación, se ha demostrado que la síntesis de péptidos es escalable y puede aumentarse a lotes de fabricación. El péptido se produce mediante síntesis en fase sólida en un sistema automatizado y luego se purifica mediante HPLC. Se requieren dos etapas químicas adicionales y una purificación final adicional por HPLC hasta una especificación de pureza de > 95 %. El producto se confirma mediante espectrometría de masas por electropulverización. Como solo se requieren 12 ng de péptido por prueba, los lotes de 1-2 mg de péptido tienen un tamaño adecuado. La Figura 21 muestra datos analíticos típicos de un lote completo de MOL600c.

Ejemplo 9: Desarrollo de purificación de anticuerpos

El proceso de purificación usado con el antisuero CF1064 junto con el sistema de péptido truncado optimizado se desarrolló inicialmente para trabajar en columnas de estreptavidina cargadas con MOL600 y una columna de absorción cargada con MOL600c. Si bien este proceso produce anticuerpos efectivos con buenas características de reactividad cruzada, se requirieron mejoras adicionales para mejorar la consistencia y reducir el número de etapas manuales para la automatización.

Para explorar un método más refinado con el uso de una solo paso, se probaron otros formatos de columna y se demostró que eran factibles y con potencial para ser automatizados (Figura 22). Se han usado dos tipos de columnas diferentes y los procesos han variado desde un método de un solo paso hasta un método de

posabsorción en donde se eliminan las interacciones no deseadas para reducir la unión no específica en el ensayo. La mejor opción para la fabricación es un proceso de un solo paso y esto puede lograrse con el uso del péptido MOL615 conjugado con el portador BSA y luego derivatizado en una columna de sefarosa NHS.

MOL615: $\text{NH}_2\text{-Cyc -DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Oxima}$

El componente de anticuerpo en el prototipo se formula como un conjugado de oro seco en una almohadilla de conjugado dentro del conjunto de flujo lateral. Se han establecido las condiciones para la estabilización del conjugado de oro y se han optimizado aún más. La cantidad de anticuerpo que se calcula que se requiere por prueba se estima en 85 ng, lo que es suficiente para generar los lotes de validación necesarios para lograr la marca CE. A largo plazo, será necesario desarrollar un reactivo policlonal adicional y, como solución más permanente, un monoclonal. Se han iniciado nuevas inmunizaciones y ya se han identificado fuertes títulos de anticuerpos contra el péptido objetivo (Figura 10). Se utilizarán varias opciones para la generación monoclonal, que incluyen la tecnología de hibridomas comercial y también el tamizaje interno de fagos y la generación de fab (Mologic York y Scotia Biologics).

Ejemplo 10: Tampón de la muestra

La extracción de la muestra del hisopo, la disolución del péptido y las condiciones óptimas de digestión de la sialidasa son los requisitos principales del tampón de la muestra. Se usó la siguiente formulación:

Acetato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0 que contiene BSA 0,1%, Tween-20 0,125% y Tritón X-100 0,375%

El tampón se ha usado con éxito para correr dispositivos en seco y también extraer muestras reales en la recuperación de la adición.

Ejemplo 11: Dispositivo de flujo lateral

Se construyó un dispositivo de flujo lateral de acuerdo con la Figura 4.

Se evaluó la estabilidad de un lote de dispositivos de flujo lateral a 37 °C durante 12 semanas. Después de 6 semanas, las señales mejoraron en valor con respecto a las mediciones anteriores, sin embargo, la forma de las curvas y el intervalo dinámico parecieron relativamente consistentes (ver Figura 23).

Ejemplo 12: Optimización del ensayo

Para satisfacer un rendimiento factible, se evaluaron factores de especificación como la duración del tiempo de ensayo, la sensibilidad de la respuesta al marcador, la fuerza de la señal de línea y la calidad de la curva estándar.

Se ha demostrado que el ensayo funciona con un tiempo de incubación de 5 minutos. Esto mantendría el tiempo total del ensayo dentro de los 15 minutos desde la recolección de la muestra recogida con hisopo hasta la lectura del resultado. En la industria del diagnóstico *in vitro*, 15 minutos es generalmente la norma como límite superior para una prueba rápida en el punto de atención.

Se cree que el intervalo relevante completo del marcador (sialidasa) es de 4 U/ml a 250 U/ml. Esto se basa en la literatura mediante la estimación de la dispersión de conjuntos de datos de muestra en relación con un ensayo de referencia de sialidasa fluorescente (Marconi y otros, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2013, vol. 167, páginas 205-209). Existen suposiciones hechas en este enfoque ya que en la afección de BV estarán presentes varios fenotipos diferentes (sialidasas bacterianas) en la muestra ya que aproximadamente 20 especies bacterianas diferentes se han asociado con la afección. El ensayo se ha probado en esta gama de sialidasa en tampón y se ha logrado una curva estándar que representa esta gama en el flujo lateral (Figura 24).

El ensayo también se ha probado en muestras de sanos reales y la señal se ha recuperado añadiendo sialidasa. Se ha demostrado que si una muestra se centrifuga o no, no marca la diferencia. La apariencia de la línea de prueba no se afectó negativamente por la presencia de matriz de la muestra (Figura 25). Para que la muestra tenga suficiente movilidad, se encontró que 0,5 ml de tampón de muestra diluyente es demasiado concentrado ya que las muestras retuvieron demasiada viscosidad. Actualmente, 1 ml se considera la cantidad adecuada de tampón a usar.

Ejemplo 13 Generación adicional de anticuerpos

El siguiente péptido, designado MOL616, se eligió para generar más anticuerpos:

Dpr(AOA)-dSer-Nva-Cyc-dAla-Ser(Gal)-dAla-Arg-Phe-dSer-Val-NH₂.

La fórmula química de MOL616 se muestra en la **Figura 26**.

El péptido se acopló a KLH, produciendo un inmunógeno denominado KLH-MOL616. Se inmunizaron conejos (*Oryctolagus cuniculus*) con KLH-MOL616 y se capturaron esplenocitos y se tamizaron con una versión truncada de este péptido (MOL615, conjugado con BSA). Se llevaron a cabo pantalla de conteos con la forma sialilada del péptido MOL615, MOL615c. El proceso de tamizaje involucró un tamizaje de clones múltiples seguido de un tamizaje de subclones para producir un anticuerpo específico para la forma desialilada.

Este proceso condujo a la generación de un anticuerpo monoclonal denominado anticuerpo 125.1. Este anticuerpo es específico para un epítipo presente en la molécula

desialilada Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg-PEG-Oxima, más particularmente para un epítipo presente en el péptido desialilado Cyc-DAla-Ser[Gal]-DAla-Arg.

Se biotiniló MOL615 para producir MOL600 (secuencia proporcionada en el Ejemplo 7) y se midió la afinidad y la cinética de unión del anticuerpo con el uso de bioinferometría. Brevemente, MOL600 o MOL600c se inmovilizó en un biosensor mediante interacción estreptavidina/biotina. La unión del anticuerpo se detectó mediante un cambio en la interferencia de la luz reflejada.

Con el uso de diferentes concentraciones del anticuerpo 125.1 (1, 2, 4, 8 o 16 nM respectivamente) la siguiente afinidad de unión y la cinética se determinaron para anticuerpo 125.1:

$$K_D = 7,9 \text{ nM}; K_{on} = 54080 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}; K_{off} = 0,000427 \text{ s}^{-1}$$

La unión fue claramente específica para MOL600 en comparación con la forma sialilada, MOL600c, como se muestra en la Figura 27.

Se secuenció el anticuerpo y se determinó que tenía una cadena pesada gamma y una cadena ligera Kappa. Las secuencias de este anticuerpo se muestran en la Figura 31 y se enumeran a continuación.

Cadena pesada de anticuerpo

QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYSMDWVRQAPGKGLEWVGGITTTLHTF
YATWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTDDAATYFCARGGSSVIWGPGLTVTVSSGQ
PKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQS
SGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVF
IFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTI
RVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREEL
SSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSGSYFLYSKLSVPTSE
WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPG (SEQ ID NO: 7)

Cadena ligera de anticuerpo

ALVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYGNHNLNWHQQKRGQPPKQLIGSASRL
ASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGSYYNGAWYVAFGGGTELEIK
RDPVAPSVLLFPPSKEELTTGTATIVCVANKFYPSDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQ
SPEDNTYSLSSLTSLTSAQYNHSHSVYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC
(SEQ ID NO: 8)

Secuencias de CDR de cadena pesada

CDR1 GFSLSSY (SEQ ID NO: 1)

CDR2 TTTLH (SEQ ID NO: 2)

CDR3 GGSSVI (SEQ ID NO: 3)

Secuencias de CDR de cadena ligera

CDR1 QSSQSVYGNNHLN (SEQ ID NO: 4)

CDR2 SASRLAS (SEQ ID NO: 5)

CDR3 QGSYYNGAWYVA (SEQ ID NO: 6)

Observaciones notables:

Se detectó un sitio de glicosilación ligada a O adicional en la región constante de la cadena pesada entre las posiciones 213 y 216. De la imagen del gel, la forma que se glicosila en este sitio es similar en abundancia a la forma no glicosilada.

Se detectó glicosilación ligada a N en la región constante de cadena pesada N@285.

La modificación de Pyro-Glu (Q) se observó en el N-terminal de la cadena pesada.

La eliminación de lisina C-terminal de la secuencia de la región constante regular observada en la cadena pesada.

Ejemplo 14 Optimizaciones adicionales del ensayo

Para optimización adicional, se compararon dos ensayos de actividad de sialidasa diferentes (A y B, ver a continuación). La configuración del ensayo fue esencialmente como se describe en relación con la Figura 2.

Los anticuerpos de prueba se conjugaron a oro y se secaron sobre un portador, denominado en la presente descripción como una "almohadilla de conjugado". El anticuerpo de prueba en el ensayo A fue el "anticuerpo Mol615 purificado de 1064", es decir, un anticuerpo policlonal purificado a partir de suero 1064 con el uso de Mol615. El anticuerpo de prueba en el ensayo B fue un anticuerpo monoclonal denominado "125.1" (ver Ejemplo 13).

También se conjugó un anticuerpo de control con oro y se secó sobre la almohadilla de conjugado. Para el ensayo B, fue IgY de pollo, suministrado por Lampire, código de producto 7401403.

Las moléculas de captura (poliestreptavidina) se inmovilizaron en una membrana de nitrocelulosa para formar una línea de captura. Se formó una línea de captura de control separada. Para el ensayo B, este fue anticuerpos anti IgY de pollo (suministrados por Lampire, código de producto 7455207).

La almohadilla de conjugado se laminó sobre la nitrocelulosa como se muestra en la Figura 2.

La molécula indicadora de prueba, $\text{NH}_2\text{-Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg-PEG-Biotina}$ (MOL600c) se preparó y se liofilizó 1 $\mu\text{g/ml}$ o 3 $\mu\text{g/ml}$ sobre un material poroso inerte (un disco Porex) para producir un disco de sustrato indicador que comprende 36 ng de molécula indicadora por disco o 108 ng de molécula indicadora por disco respectivamente.

La sialidasa se probó a las siguientes concentraciones: 50, 12,5 y 1,56 U/ml. También se ejecutó un patrón negativo con el uso de un disco de péptidos y un tampón de ensayo. Las respuestas se midieron contra lecturas de cubos y una escala visual.

Se usó el siguiente protocolo básico:

Asegurar que todas las soluciones estén bien mezcladas y a temperatura ambiente.

Probar cada una de las condiciones deseadas con las soluciones estándar de tampón de sialidasa 50, 12,5 y 1,56 U/ml.

Probar todos los estándares y el tampón de sialidasa por triplicado.

Añadir 1000 μl de estándar de sialidasa a un tubo de extracción, junto con un disco indicador de sustrato. Sellar el tubo doblando la tapa y la tapa en su lugar. Agitar suavemente el tubo y dejar incubar durante 5 minutos con el disco indicador del sustrato.

Añadir 4 gotas del tubo de extracción al dispositivo a la almohadilla de muestra.

Leer a los 5 o 10 minutos con el uso de lector cúbico (lector OpTricon de opTricon GmbH (Chembio Diagnostic systems) de Schwarzschildstrasse 1, D-12489 Berlín, Alemania)

y registrar señales de línea de prueba y control.

Las características de los ensayos de prueba se muestran a continuación.

	Ensayo A	Ensayo B
Almohadilla de conjugado	Millipore GFDX	Ahlstrom 8951
Anticuerpo de línea de control	Anticuerpo anti oveja	Anticuerpo anti IgY de pollo
Conjugado de oro	Solo prueba	Prueba y control
Prueba de anticuerpo conjugado de oro	Anticuerpo policlonal Mol615 purificado de 1064	Anticuerpo monoclonal 125.1
Concentración de péptidos	1 µg/ml (36 ng por disco)	3 µg/ml (108 ng por disco)
Tiempo de lectura del dispositivo	10 minutos	5 minutos
OD Oro	5	4
Almohadilla de muestra	MDI FR1	MDI FR1

(i) Comparación de tiempos de lectura

El resultado deseable es tener una prueba de 10 minutos, con una incubación de 5 minutos y luego un tiempo de lectura de 5 minutos. Los resultados se leyeron a los 5 y 10 minutos para investigar el efecto del tiempo de lectura en los resultados. Los resultados se muestran en la Figura 28. Como puede observarse, el ensayo A requiere un tiempo de lectura de 10 minutos para alcanzar la respuesta correcta para el estándar inferior donde el ensayo B solo requiere un tiempo de lectura de 5 minutos. El ensayo B no parece beneficiarse significativamente de un tiempo de lectura de 10 minutos; esto cumple con el resultado deseable de una prueba de 10 minutos con una lectura de 5 minutos.

(ii) comparación de sensibilidad

Los resultados del ensayo B se leyeron después de 5 minutos y los resultados del ensayo A se leyeron después de 10 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 29.

El ensayo B muestra lecturas de cubos más altas en comparación con el ensayo A en los estándares de 50 U/ml, 12,5 U/ml y 1,56 U/ml y tiene lecturas de cubos más bajas para el estándar de 0 U/ml. Tanto A como B dan la respuesta correcta para cada uno de los estándares y el % CV está dentro de las especificaciones. El Ensayo B proporciona lecturas de cubos para los estándares después de un tiempo de desarrollo del

dispositivo más corto y con lecturas de cubos más bajas para los estándares 0. Por tanto, el ensayo B es superior al ensayo A.

(iii) Efecto de la concentración de péptidos

Los ensayos A y B se compararon entre sí y con variantes con diferentes concentraciones de péptidos. El ensayo A' correspondió al ensayo A, pero con una concentración de péptido de 3 µg/ml (108 ng por disco); Ensayo B' correspondió al ensayo B, pero con una concentración de péptido de 1 µg/ml (108 ng por disco).

Los resultados del ensayo B y B' se leyeron después de 5 minutos y los resultados del ensayo A y A' se leyeron después de 10 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 30. Las concentraciones más altas de péptidos dieron mejores resultados y se prefiere una concentración de péptidos de >1 µg/ml (> 108 ng por disco).

Conclusiones:

El ensayo B ha mejorado el rendimiento del ensayo A en un tiempo más corto debido a los cambios realizados en el anticuerpo y al aumento de la concentración de péptido.

Ejemplo 15 – Optimizaciones de ensayo adicionales

Densidad óptica de oro

Se investigó el efecto de aumentar la concentración de pulverización de conjugado de oro de OD4 a OD6 u OD8, y se encontró que mientras que el oro de OD6 daba un ligero aumento en la señal de la línea de prueba en comparación con la OD4, la OD8 daba el doble de la señal de la línea de prueba de OD4 a 3,125 U/ml de sialidasa. Por tanto, es ventajoso usar la conjugación con oro a una OD de aproximadamente o al menos 8.

Almohadilla de muestra/conjugado

En un dispositivo de ensayo de flujo lateral, tal como el tipo representado esquemáticamente en la Figura 2, la almohadilla de muestra debe permitir que la muestra fluya a lo largo del dispositivo para permitir que la muestra entre en contacto con la almohadilla de conjugado que contiene las moléculas de unión y posteriormente entre en contacto con las moléculas de captura. Dependiendo de la viscosidad de la muestra, algunos materiales de la almohadilla de muestra pueden ser ventajosos.

Para evaluar las diferentes almohadillas de muestra, se preparó un sustituto de fluido vaginal sintético con el uso de goma guar y mucina bovina (goma guar 0.25%, mucina 0,125%, látex azul 5% (Polysciences Inc., 15709, 2,6%, disuelto en agua). Se dejó correr el fluido vaginal sintético a través de todas las almohadillas de muestra. Se

registró el tiempo que tardó la muestra en recorrer la longitud de la tira reactiva (ver la tabla a continuación)

Almohadilla de muestra	Tiempo de iniciar la ventana	Tiempo para correr la longitud de la ventana
1. Separador de sangre FR1 de 10 mm	01:20	02:20
2. GF-142	01:16	02:06
3. 8964, Ahlstrom	01:17	02:07
4. 6613, Ahlstrom	01:45	01:20
5. 6615, Ahlstrom	02:20	01:30

Ahlstrom son almohadillas de fibra de vidrio de diferentes densidades (8964, 6613 y 6615 respectivamente).

Para una mayor comparación, los materiales se fabricaron con el uso de dos almohadillas de muestra (FR1 y Ahlstrom 8964). Los dispositivos se ejecutaron con el uso de una curva estándar de 4 puntos (0, 3,125, 12,5 y 50 U/ml de sialidasa en solución tampón acuosa), para determinar si la almohadilla de muestra alternativa tuvo algún efecto sobre la señal específica o inespecífica. Las muestras procesadas con la almohadilla de la muestra 8964 dieron una señal específica más alta en comparación con el FR1, sin unión no específica (NSB).

Con el uso de un conjunto de muestras clínicas enriquecidas con 6.25 U/ml de sialidasa, se determinó que una almohadilla de fibra de vidrio como la almohadilla de muestra Ahlstrom 8964 permite una detección de enzimas y un flujo de muestra muy confiable.

Ejemplo 16 - Diagnóstico de vaginosis bacteriana

Se obtuvieron y analizaron muestras clínicas en función de criterios tales como células clave para determinar una puntuación de Nugent, sobre la base de la cual las muestras se clasificaron como positivas o negativas para vaginosis bacteriana. Las muestras se analizaron con el uso del ensayo A o el ensayo B (ver el Ejemplo 14).

Los resultados se muestran a continuación, en donde se significa sensibilidad; sp significa especificidad; ppv significa valor predicho positivo; y npv significa valor predicho negativo.

Ensayo A

		Nugent	Nugent	
		POS	NEG	TOTAL
Ensayo A	POS	25	0	25
Ensayo A	NEG	2	25	27
	TOTAL	27	25	52

	se	sp	ppv	npv
estimar:	0,93	1	1	0,93
IC del 95%:	[0,76; 0,99]	[0,86; 1]	[0,86; 1]	[0,76; 0,99]
valor p:	5,65E-06	5,96E-08	5,96E-08	5,65E-06

Ensayo B

		PUNTUACIÓN DE NUGENT		
		POS	NEG	TOTAL
Ensayo B	POS	27	0	27

Ensayo B	NEG	0	25	25
	TOTAL	27	25	52

	se	sp	ppv	npv
estimar:	1	1	1	1
IC del 95%:	[0,87; 1]	[0,86; 1]	[0,87; 1]	[0,86; 1]
valor p:	1,49E-08	5,96E-08	1,49E-08	5,96E-08

Por tanto, ambos ensayos funcionaron bien para distinguir entre muestras clínicas positivas o negativas para la vaginosis bacteriana. El ensayo B fue superior al ensayo A.

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, a los expertos en la técnica les resultarán evidentes varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente descripción a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, se considera que todos los aspectos y modalidades de la invención descritos en la presente descripción son ampliamente aplicables y combinables con cualquiera y todas las demás modalidades consistentes, que incluyen las tomadas de otros aspectos de la invención (que incluyen de forma aislada) de acuerdo con sea apropiado. En la presente descripción se citan varias publicaciones, cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad.