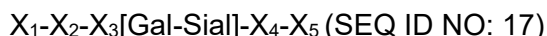


REIVINDICACIONES MODIFICADAS ART.34

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

(i) una molécula indicadora que comprende

(a) un péptido que comprende la siguiente secuencia:



en donde:

Sial es un grupo sialilo;

X_3 es un aminoácido que comprende un grupo aceptor de glicosilo y se selecciona de Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp, Asn, Arg o fosfoserina (SEP), preferentemente en donde X_3 es Ser; y

X_1 , X_2 , X_4 y X_5 se seleccionan independientemente de cualquier aminoácido siempre que al menos uno, preferentemente al menos dos o tres, 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; y

b) un sitio de captura que permanece intacto tras la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por una enzima sialidasa presente en la muestra;

(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.

2. El dispositivo, kit de la reivindicación 1, en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es Ala, preferentemente en donde X_1 y X_2 son ambos Ala, y/o preferentemente en donde Ala es D Ala o β Ala.

3. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde al menos uno de X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es un aminoácido cargado, opcionalmente en donde cada aminoácido cargado se selecciona de Arg, D Asp y L Orn.

4. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos uno de X₁, X₂, X₄ y X₅ es un aminoácido polar, opcionalmente en donde cada aminoácido polar se selecciona de L-Ser, D-Ser y Thr.

5. El dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el péptido comprende la siguiente secuencia:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂[Gal-Sial]-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀

(SEQ ID NO: 10) en donde:

Sial es un grupo sialilo

X₁ está ausente o es Thr

X₂ está ausente o es D-Ala

X₃ está ausente o es Nle

X₄ está ausente o es Glu

X₅ está ausente o es D-Ala

X₆ está ausente o es Arg

X₇ está ausente o se selecciona de Glu, Arg, Ser, Nva, βAla

X₈ está ausente o se selecciona de D-Ser, D-Ala, SEP, Cyc

X₉ está ausente o se selecciona de Nva, BIP, D-Ala, βAla, Orn

X₁₀ se selecciona de Cyc, Ser, Ile, D-Ala, D-Ser

X₁₁ se selecciona de D-Ala, Pro, Orn, Nle

X₁₂ se selecciona de Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp, Asn, Arg o SEP, preferentemente Ser

X₁₃ se selecciona de D-Ala, BIP, βAla

X₁₄ se selecciona de Arg, D-Asp, Nle, Orn, Nva

X₁₅ está ausente o se selecciona de Phe, BIP, Ser, Glu, D-Ala, D-Ser

X₁₆ está ausente o se selecciona de D-Ser, Glu

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

X₁₈ está ausente o es Cha

X₁₉ está ausente o es D-Ser

X₂₀ está ausente o es Val.

6. El dispositivo o kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el péptido comprende, o consiste en, la siguiente secuencia:

(i) Cyc-D-Ala-Ser[Gal-Sial]-D-Ala-Arg (SEQ ID NO: 11)

(ii) Glu-D-Ser-Nva-Cyc-D-Ala-Ser[Gal-Sial]-D-Ala-Arg-Phe-D-Ser-Val (SEQ ID NO: 12)

- (iii) Arg- DAla -BIP-Ser-Pro-Ser[Gal-Sial]- DAla - DAsp -Ser (SEQ ID NO: 13)
- (iv) Ser-SEP- DAla -Ile-Orn-Ser[Gal-Sial]- DAla -Nle-Glu (SEQ ID NO: 14)
- (v) DAla -Arg-Nva- DAsp - 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- DAsp -Pro-Ser[Gal-Sial]- βAla -Nva- DAsp -Glu-Thr-Cha- DAsp -Val (SEQ ID NO: 16).

7. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el péptido se predispone a la escisión por una o más sialidasas específicas, opcionalmente en donde una o más sialidasas específicas son de origen bacteriano, opcionalmente en donde las bacterias son especies *Prevotella*, *Bacteroides* y/o *Mobiluncus* y/o *Gardnerella vaginalis*.

8. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la molécula de unión es específica para la forma desialilada del péptido definido en la reivindicación 6, preferentemente es específica para un epítipo que está presente en el motivo peptídico Cyc- DAla -Ser[Gal]- DAla -Arg y que está ausente o es críptico en el correspondiente motivo peptídico sialilado Cyc- DAla -Ser[Gal-Sial]- DAla -Arg.

9. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la molécula de unión es 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 SEQ ID NO: 1; la CDR2 de cadena pesada tiene SEQ ID NO: 2; la CDR3 de cadena pesada tiene SEQ ID NO: 3; la CDR1 de cadena ligera tiene SEQ ID NO: 4; la CDR2 de cadena ligera tiene SEQ ID NO: 5; y la CDR3 de cadena ligera tiene SEQ ID NO: 6, preferentemente en donde la cadena pesada tiene SEQ ID NO: 7 y/o la cadena ligera tiene SEQ ID NO: 8.

10. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la molécula de unión se marca con una molécula indicadora, preferentemente una partícula de oro.

11. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el sitio de captura de la molécula indicadora comprende o consiste en una molécula de biotina o una porción de oxima; y/o está en el extremo N o C terminal del péptido.

12. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sitio de captura de la molécula indicadora se une al péptido mediante un enlazador, opcionalmente en donde el enlazador comprende una porción polietilenglicol (PEG), opcionalmente en donde el péptido se une a un grupo biotina en su extremo N o C terminal a través de un enlazador que comprende, o consiste en, una porción de polietilenglicol.

13. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la molécula indicadora comprende, o consiste en, 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.

14. El dispositivo o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la molécula indicadora comprende (i) un péptido que comprende o consiste en la secuencia Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg; y (ii) un sitio de captura que comprende o consiste en una molécula de biotina o una porción de oxima que se une opcionalmente al extremo N o C terminal del péptido mediante un enlazador que comprende o consiste en una porción de polietilenglicol; y en donde la molécula de unión es un anticuerpo como se define en la reivindicación 8 o 9 y preferentemente se marca con una molécula indicadora, con la máxima preferencia una partícula de oro.

15. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a (i) el derivado desialilado de un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7; o a (ii) una molécula indicadora como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 u 11-14, en donde el anticuerpo se une preferentemente al derivado desialilado sobre el péptido sialilado o la molécula indicadora.

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo es como se define en las reivindicaciones 8, 9 y/o 10.
17. Una molécula indicadora adecuada para su uso en la detección de la presencia en una muestra de prueba de la actividad de escisión de una enzima sialidasa, que comprende la molécula indicadora:
- a) un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7; 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, en donde la molécula indicadora es preferentemente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 u 11-14.
18. La molécula indicadora de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la molécula indicadora es como se define en la reivindicación 13.
19. Un péptido que comprende 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-SEP-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)
20. El péptido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el péptido es un péptido que comprende o consiste en la secuencia Cyc-DAla-Ser[Gal-Sial]-DAla-Arg.
21. Un péptido para su uso en la generación de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde el péptido es un derivado desialilado del péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

22. 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 reivindicaciones 1-7 u 11-14 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 sialidasa enzima presente en la muestra y en donde las moléculas de unión son preferentemente como se define en las reivindicaciones 8, 9 y/o 10;
- (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.

23. 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 reivindicaciones 1-7 u 11-14, en donde dichas moléculas de captura permanecen unidas al sitio de captura independientemente de si ocurre 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 ocurra la escisión del grupo sialilo de la molécula indicadora por la enzima sialidasa presente en la muestra y en donde las moléculas de unión son preferentemente como se definen en las reivindicaciones 8, 9 y/o 10;
- (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.

24. 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 reivindicaciones 1-7 u 11-14 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 sialidasa enzima presente en la muestra y en donde las moléculas de unión son preferentemente como se define en las reivindicaciones 8, 9 y/o 10;
- (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 diagnóstica vaginosis bacteriana.

25. 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 reivindicaciones 1-7, en donde la molécula indicadora se liofiliza preferentemente sobre un portador;
- (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, en donde las moléculas de captura comprenden preferentemente estreptavidina;
- (iii) un soporte sólido al que las moléculas de captura pueden unirse, o se unen, para formar una zona de captura para recibir la muestra de prueba, en donde el soporte sólido preferentemente comprende nitrocelulosa; 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 y en donde las

moléculas de unión son preferentemente como se definen en las reivindicaciones 8, 9 y/o 10; y opcionalmente

(v) un tubo de extracción y/o un tampón; y/o

(vi) moléculas de detección de control y ligandos de detección de control.

26. El uso de un dispositivo de detección de enzimas o kit de detección de enzimas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-24 o el kit de detección de enzimas de acuerdo con la reivindicación 25 para diagnosticar vaginosis bacteriana en una muestra de prueba.