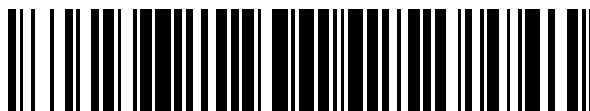


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 774**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02802505 .4**

96 Fecha de presentación: **31.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1461078**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

54 Título: **Análisis de polarización por fluorescencia basado en péptidos para la detección de anticuerpos contra Mycobacterium bovis**

30 Prioridad:
31.10.2001 US 335368 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2012

73 Titular/es:
**DIACHEMIX LLC
223 NORTH WATER STREET, SUITE 500
MILWAUKEE, WI 53202, US**

72 Inventor/es:
**SURUJBALLI, Om, P.;
ROMANOWSKA, Anna;
JOLLEY, Michael, E. y
NASIR, Mohammad, Sarwar**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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

ES 2 379 774 T3

DESCRIPCIÓN

Análisis de polarización por fluorescencia basado en péptidos para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium bovis*

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de análisis para diagnóstico. Más específicamente, la presente invención se refiere a un análisis basado en péptidos que utiliza los cambios en la polarización por fluorescencia para detectar anticuerpos del suero contra *Mycobacterium bovis*.

Descripción de la técnica relacionada

La polarización por fluorescencia es una técnica muy conocida que se ha utilizado para numerosas aplicaciones, incluyendo diagnósticos de enfermedades, detección de patógenos transmitidos por los alimentos y la determinación de micotoxina en cereales. Véase M. S. Nasir, M. E. Jolley (1999) "Flourescence Polarization: An analytical tool for Immunoassay and Drug Discovery." *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 2, págs. 177-190. Los puntos fuertes globales de los análisis de polarización por fluorescencia consisten en la simplicidad, facilidad, rapidez y rentabilidad de los protocolos de los ensayos. Por ejemplo, los análisis de polarización por fluorescencia por lo general no requieren etapas de lavado.

En general, un análisis de polarización por fluorescencia para la detección de enfermedades se realiza de la manera siguiente. Se añade una pequeña cantidad de muestra en un tubo que contiene una solución tampón. Se lee un blanco en el instrumento. Se añade un trazador fluorescente específico para la enfermedad en el mismo tubo y se observa el valor de polarización resultante en segundos a minutos.

En la patente US nº 6.110.750, se dio a conocer una técnica de polarización por fluorescencia para la detección de animales infectados con *Mycobacterium bovis*. La técnica estaba basada en la proteína MPB70 segregada por *M. bovis*. La proteína MPB70 se consideró que era un antígeno inmunodominante específico de la especie que contiene por lo menos tres epítomos específicos de *M. bovis* independientes. La técnica de polarización por fluorescencia utilizó un trazador que contiene proteína MPB70 conjugada con un fluoróforo para detectar anticuerpos contra *M. bovis* en sueros de animales, tales como vacas, bisontes, llamas y alces. M. Lin *et al.* (1996) "Modification of the *Mycobacterium bovis* Extracellular Protein MPB70 with Fluorescein for Rapid Detection of Specific Serum and Antibodies by Fluorescence Polarization" *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. nº 4, págs. 438-443 da a conocer un trazador que comprende la proteína extracelular MPB70 de *M. bovis* conjugada con un fluoróforo y un procedimiento de detección de animales infectados con *M. bovis* utilizando este conjugado en un análisis de polarización por fluorescencia.

Sin embargo, para aumentar la sensibilidad potencial de los análisis de polarización por fluorescencia de *M. bovis*, es deseable desarrollar trazadores con fluorescencia a base de moléculas más pequeñas que MPB70.

Sumario de la invención

En un primer aspecto principal, la presente invención proporciona un análisis para la detección de animales infectados por *M. bovis*. Un trazador, que comprende un péptido de la proteína MPB70 de *M. bovis* conjugado con un fluoróforo, se añade a una muestra de suero de un animal para formar una mezcla. Se mide a continuación la polarización por fluorescencia de la mezcla. La presencia de anticuerpos de *M. bovis* en el animal se detecta a partir de la polarización por fluorescencia medida de la mezcla.

En un segundo aspecto principal, la presente invención proporciona un trazador para su utilización en un análisis de polarización por fluorescencia para anticuerpos específicos para *M. bovis*. El trazador comprende un péptido de la proteína MPB70 de *M. bovis* conjugado con un fluoróforo, de tal manera que el trazador puede unirse a anticuerpos específicos para *M. bovis* para producir un cambio detectable en la polarización por fluorescencia.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

En numerosos péptidos diferentes de MPB70 se identificó su idoneidad para detectar anticuerpos del suero contra *M. bovis* utilizando polarización por fluorescencia. En la presente memoria se describen los efectos específicos.

Ejemplo 1

Se preparó un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos: PTNAAFSKLPASTIDELKTN (Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser Thr Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn) (Ref. nº 554. SEC. ID. nº 1).

El péptido se marcó a continuación de la manera siguiente. Se disolvió el péptido (2 mg/ml) en bicarbonato sódico 1 M pH 8,3 a temperatura ambiente. Se disolvió a continuación un colorante, éster succinimidílico de carboxifluoresceína (10 mg/ml) (5-FAM, SE, Molecular Probes, Oregon) en sulfóxido de dimetilo (SODM, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canadá) y se añadió una cantidad suficiente a la solución del péptido para dar una relación molar colorante:péptido de 1:1. Se agitó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió a la mezcla hidroxilamina tamponada a pH 8,5 (Molecular Probes) y se continuó agitando durante 30 minutos más. A continuación se añadió la mezcla a una columna fina Sephadex G-25 (1x50 cm), que se equilibró previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato sódico 0,01 M + cloruro sódico al 0,85%, pH 7,2) enriquecida con azida sódica al 0,02%. El péptido marcado se separó del colorante libre por elución con PBS. Se recogieron las fracciones (1 ml) y se hizo seguimiento de la absorbancia a 492 nm. El perfil de elución presentaba 2 picos bien separados, el primero de los cuales contenía el péptido marcado por fluorescencia. Las fracciones que contienen el primer pico se mezclaron a continuación y se concentraron utilizando una celda de ultrafiltración de Amicon (Millipore Corporation, Nepean, Ontario, Canadá) equipada con una membrana YM-1 de Amicon (Millipore).

En este péptido marcado se analizó a continuación su idoneidad utilizada como trazador fluorescente para detectar anticuerpos del suero contra *M. bovis*. Específicamente, el péptido marcado se analizó añadiéndolo a muestras de suero de vacas, alces y ciervos, algunos de los cuales son positivos conocidos para la infección por *M. bovis* y algunos de los cuales son negativos conocidos para la infección por *M. bovis*. Se descubrió que los sueros positivos y negativos daban diferentes mediciones de polarización por fluorescencia después de añadir el péptido marcado. De este modo, se determinó que este péptido marcado puede utilizarse para detectar anticuerpos del suero contra *M. bovis*.

Ejemplo 2

Se preparó un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos: SVQGMSQDPVAVAASNNPEL (Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala Ser Asn Asn Pro Glu Leu) (Ref. nº 555; SEC. ID. nº 2).

Este péptido se marcó y purificó utilizando los procedimientos descritos en el ejemplo 1, excepto que se utilizó un colorante diferente, éster succinimidílico de fluoresceína-5-EX (Molecular Probes), y la relación molar colorante:péptido fue 20:1. Este compuesto colorante tiene un grupo reactivo de succinimidilo que está separado del fluoróforo por un separador de siete átomos. Este separador minimiza la interacción entre el fluoróforo y los aminoácidos con los que el colorante está conjugado.

Este péptido marcado se analizó a continuación tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1. Se descubrió que este péptido marcado puede utilizarse también para detectar anticuerpos del suero contra *M. bovis*, es decir, que los sueros positivo y negativo dieron diferentes mediciones de polarización por fluorescencia en la adición del péptido marcado.

Ejemplo 3

La proteína MPB70 era el epítipo explorado para preparar pequeños péptidos fluorescentes. La exploración del epítipo se realizó utilizando un bloque de síntesis de péptidos Multipin™ (DKP escindible, nº en catálogo KT-96-0-DKP, lote nº 1252-2A) constituido por 96 engranajes, que se adquirió en Mimotypes Pty Ltd., Calyton, Victoria, Australia. Se utilizó específicamente este kit, según las instrucciones de Multipin™ para sintetizar 96 péptidos de 15 aminoácidos cada uno, correspondiente cada uno a un péptido de MPB70. Después de la síntesis, cada péptido se acopló por enlace covalente con 6-carboxifluoresceína (isómero 2). Los engranajes se lavaron a continuación con DMF en exceso y metanol, y el bloque resultante se sumergió durante la noche en una placa de 96 pocillos hondos (1 ml de capacidad, conteniendo cada pocillo 800 microlitros de solución 0,1 M:CH₃CN (60:40)) para obtener soluciones del péptido libre marcado.

Las soluciones de péptido marcado libre se diluyeron a continuación de manera apropiada para realizar los análisis de polarización por fluorescencia. Cada péptido marcado se analizó añadiéndole a suero vacuno, tanto positivo como negativo para *M. bovis*, y midiendo la polarización por fluorescencia resultante. De esta manera, se descubrió que dos péptidos marcados podrían utilizarse para detectar anticuerpos en el suero contra *M. bovis*, es decir, que los sueros positivo y negativo proporcionaron diferentes mediciones de polarización por fluorescencia en la adición del péptido marcado. Dos péptidos prometedores presentaban las siguientes secuencias de aminoácidos: AVAASNNPELTTLTA (Ala Val Ala Ala Ser Asn Asn Pro Glu Leu Thr Leu Thr Ala) (SEC. ID. nº 3) y PTNAAFSKLPASTID (Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser Thr Ile Asp) (SEC. ID. nº 4).

Ejemplo 4

Se generaron péptidos adicionales y se marcaron esencialmente como se describió anteriormente. Los péptidos se marcaron con 6-carboxifluoresceína (6-FAM o 6-fam; Sigma-Aldrich nº 54115, Molecular Probes nº C-1360 o nº C-6164 (éster succinimidílico de 6-FAM)). Las secuencias de los péptidos eran:

6-fam-GMSQDPVAVAASNNPELTTLTAALS (Ref. nº 708; SEC. ID. nº 5) y
6-fam-SVQGMSQDPVAVAASNNPELTTLTAALS (Ref. nº 799; SEC. ID. nº 6).

- 5 Los péptidos, así como la proteína MPB70 completa, se utilizaron en análisis de polarización por fluorescencia como se describió anteriormente para identificar sueros de animales infectados con *Mycobacterium bovis* así como animales no infectados. Los análisis de polarización por fluorescencia fueron positivos para la infección por *Mycobacterium bovis* cuando la polarización por fluorescencia medida superaba un valor umbral predeterminado. Los diagramas siguientes resumen los resultados de estos ensayos:

FUENTE DEL SUERO	Nº de Sueros	Clasificación	MPB70		Péptido 555		Péptido 708		Péptido 799		Péptido 554	
			Sens.%	Espec. %	Sens.%	Espec.%	Sens.%	Espec.%	Sens.%	Espec.%	Sens.%	Espec.%
Norteamérica	5666	Posible negativo		98.3 (5570/5666)								
Canadá	28	Cultivo positivo	92.9 (26/28)									
Nº1	50	Positivo en prueba cutánea	36 (18/50)	N.D.	76 (38/50)	N.D.						
Nº2	90	Positivo en prueba cutánea 17 Positivo en prueba cutánea 73	64.7 (11/17)	98.6 (72/73)	82.4 (14/17)	97.3 (71/73)						
Nº3	49	Positivo en lesión	55.1 (27/49)	N.D.	61.2 (30/49)	N.D.			67.3 (33/49) 71.4 (35/49) (péptidos 555+799)	51.0 (25/49) 71.4 (35/49) (péptidos 555+554+799)		
Norteamérica	557	Posible negativo				98.75 (550/557)					98.75 (550/557)	
Ontario 02	69	Positivo en prueba cutánea 65 Negativo en prueba cutánea 4					55.4 (36/65)	25 (1/4)			5/63 (1 único) 58 (40/69) (péptidos 708+554)	
	48	Positivo en lesión	56.3 (27/48)		71.4 (30/42)		64.4 (29/45)		68.8 (33/48) 72.9 (35/48) (péptidos 708+799)	46.5 (25/48)		

Listado de secuencias

<110> Diachemix LLC

5 <120> Análisis de polarización por fluorescencia basado en péptidos para la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium bovis*

<130> 150-224

10 <140> EP 02 802 505.4
<141> 2002-10-31

<150> US 60/335,368
<151> 2001-10-31

15 <160> 6

<170> Patente en version 3.1

20 <210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> *Mycobacterium bovis*

25 <400> 1
Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser Thr Ile Asp Glu
1 5 10 15
Leu Lys Thr Asn
20

<210> 2
<211> 20
30 <212> PRT
<213> *Mycobacterium bovis*

<400> 2
Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala Ser Asn
1 5 10 15
Asn Pro Glu Leu
20

35 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mycobacterium bovis*

40 <400> 3
Ala Val Ala Ala Ser Asn Asn Pro Glu Leu Thr Thr Leu Thr Ala
1 5 10 15

45 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mycobacterium bovis*

<400> 4
50 Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser Thr Ile Asp
1 5 10 15

<210> 5
<211> 25
55 <212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (1)..(1)

<223> marcado en el extremo amino con 6-FAM

<400> 5

Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala Ser Asn Asn Pro Glu
1 5 10 15

Leu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ser
20 25

10

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> marcado en el extremo amino con 6-FAM

20

<400> 6

Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala Ser Asn
1 5 10 15

Asn Pro Glu Leu Thr Thr Leu Thr Ala Ala Leu Ser
20 25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar animales infectados con *M. bovis*, comprendiendo el procedimiento:
 - añadir un trazador a una muestra de un animal para formar una mezcla, en el que el trazador es un péptido de la proteína MPB70 de *M. bovis* conjugada con un fluoróforo y en el que el péptido está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC. ID. nº 2 y SEC. ID. nº 6;
medir la polarización por fluorescencia de la mezcla; y
 - detectar la presencia de anticuerpos contra *M. Bovis* en el animal procedente de la polarización por fluorescencia medida de la mezcla.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además:
medir la polarización por fluorescencia de una referencia; y
comparar la polarización por fluorescencia de la mezcla con la polarización por fluorescencia de la referencia.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra es el suero.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fluoróforo es la fluoresceína o un derivado de la misma.
5. Trazador para detectar anticuerpos contra *M. bovis* en el análisis de polarización por fluorescencia, en el que el trazador comprende un péptido de la proteína MPB70 de *M. bovis* conjugado con un fluoróforo, de tal manera que el trazador se une a anticuerpos específicos para *M. bovis* para producir un cambio detectable en la polarización por fluorescencia; en el que el péptido está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por la SEC. ID. nº 2 y SEC. ID. nº 6.
6. Trazador según la reivindicación 5, en el que el péptido está constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2.
7. Trazador según la reivindicación 5, en el que el péptido está constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. nº 6.
8. Trazador según la reivindicación 7, en el que el fluoróforo es la 6-carboxifluoresceína.
9. Kit para la detección de anticuerpos contra *M. bovis* en una muestra extraída de un animal, en el que los anticuerpos se detectan utilizando polarización por fluorescencia y el kit comprende un trazador según la reivindicación 5.