

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 672**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/FR2013/050504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13715295 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2825883**

54 Título: **Péptidos de interferencia y procedimiento de detección de microorganismos**

30 Prioridad:

09.03.2012 FR 1252142

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

03.07.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**BETTSWORTH, FLORENCE;
POTHION, CATHERINE y
SEIGNERES, BÉATRICE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 674 672 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de interferencia y procedimiento de detección de microorganismos

- 5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico. En particular, se refiere a nuevos péptidos particularmente útiles para eliminar los problemas de interferencia en el ámbito de la detección *in vitro* por análisis inmunológico de la presencia de un microorganismo en una muestra biológica, estando los problemas de interferencia relacionados con la muestra ensayada.
- 10 Los métodos de detección por análisis inmunológico se utilizan ampliamente en el campo del diagnóstico. Estos métodos permiten detectar unos analitos en forma de proteínas (antígeno/anticuerpo), de péptidos, y de haptenos, como los esteroides o las vitaminas. El análisis inmunológico, también denominado procedimiento de inmunoanálisis o ensayo inmuno-enzimático, es un procedimiento ampliamente conocido por el experto en la materia, que implica reacciones inmunológicas entre el analito a detectar y uno o más pares de unión a este analito. A título de ejemplo de tales procedimientos de inmunoanálisis, se pueden citar los métodos tales como ELISA, ELFA, CLIA, ECLIA, IRMA y RIA que pueden funcionar según el principio del “sándwich” o también según el principio de la “competición” y los métodos de inmunodetección como la inmunohistoquímica, la inmunocitoquímica, la inmunofluorescencia, la transferencia wester y el Dot-blot.
- 15
- 20 Los resultados de estos análisis inmunológicos se proporcionan después por un laboratorio a un profesional de sanidad, que los interpretará para diagnosticar un estado patológico y después dar un tratamiento apropiado al paciente. Por lo tanto, es particularmente importante que estos análisis sean al mismo tiempo altamente sensibles, en el sentido que no den resultados falsamente negativos, y altamente específicos, en el sentido que no den resultados falsamente positivos.
- 25 Una de las causas que alteran la sensibilidad y, sobre todo, la especificidad de estos análisis es la presencia de interferencias relacionadas con la muestra ensayada. Se produce una interferencia cada vez que una sustancia de la muestra a ensayar produce una reacción que modifica la señal del ensayo, alterando así el valor correcto del resultado, por ejemplo proporcionando una señal que no puede distinguirse de la del analito, dando así falsos positivos, o disminuyéndola, dando así potencialmente falsos negativos cuando la señal es inferior al umbral de detección del kit utilizado (Tate y Ward, 2004).
- 30 En el ámbito de los análisis inmunológicos, las reacciones falsamente positivas se relacionan muy frecuentemente con reacciones no específicas antígeno-anticuerpo debidas a la presencia, en la muestra ensayada, de sustancias interferentes con respecto al análisis, tales como anticuerpos, que se unen a los pares de unión utilizados para el análisis. Por ejemplo, el suero de algunos pacientes puede contener unos anticuerpos humanos dirigidos contra unas proteínas animales, generados, por ejemplo, después de la vacunación, los cuales son capaces de reaccionar con las inmunoglobulinas animales que entran en la composición del kit de análisis empleado. Puede generar así unos resultados de análisis aberrantes (Kicka, 1999). Las sustancias endógenas interferentes pueden estar presentes al mismo tiempo en las muestras obtenidas en los sujetos sanos y en las obtenidas en los sujetos que presentan una patología o que tienen una infección. El fenómeno de interferencia es independiente del estado clínico del paciente.
- 35 Ya se han descrito diversos procedimientos para reducir las reacciones de interferencia relacionadas con la muestra ensayada. Así, por ejemplo, se conoce utilizar unos compuestos glucídicos, unos compuestos proteicos, unas mezclas de proteínas o unos hidrolizados (EP0260903; US4,931,385). Se ha descrito también la utilización de proteínas modificadas, y en particular de las proteínas succiniladas o acetiladas (EP0525916), o bien unos péptidos de secuencias en aminoácidos esencialmente modificados con respecto a la secuencia nativa, por ejemplo unos péptidos constituidos esencialmente de D-(aminoácidos) (US6,153,393). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos permite eliminar completamente la presencia de falsos positivos en el análisis y la adición de estas sustancias conllevan incluso, a veces, otras interferencias, disminuyendo la sensibilidad del ensayo.
- 40 Otras reacciones falsamente positivas pueden deberse, no a la muestra ensayada, sino a los propios pares de unión utilizados para el ensayo, como por ejemplo cuando se quiere detectar en una misma muestra, al mismo tiempo, unos antígenos y unos anticuerpos, como se describe en la solicitud de patente WO2008/027942. Sin embargo, estas interferencias relacionadas con los pares de unión son diferentes de las relacionadas con la muestra analizada y los procedimientos utilizados para reducir este tipo de interferencia son diferentes de los utilizados para reducir las interferencias relacionadas con la muestra analizada.
- 45 En la medida en la que no se eliminan todas las interferencias, los laboratorios están obligados, a veces, a realizar unos análisis alternativos o unas mediciones suplementarias a fin de verificar el resultado de su ensayo de diagnóstico. Por lo tanto, es muy importante tener unos análisis en los que las interferencias se han disminuido, incluso eliminado, en particular cuando se trata de falsos positivos, ya que los pacientes recibirían entonces una medicación que no necesitan.
- 50
- 55
- 60
- 65 La solicitante ha puesto en evidencia, de manera inesperada, que durante el análisis inmunológico en el ámbito de la

5 detección *in vitro* de la presencia de un microorganismo, era posible, para eliminar la detección de falsos positivos en las muestras ensayadas, debido a las interferencias relacionadas con estas muestras ensayadas, y esto sin disminuir la sensibilidad del ensayo, utilizar unos péptidos particulares procedentes de este microorganismo, así como unos péptidos que presentan al menos un 50% de identidad con estos primeros péptidos, pero procedentes de un microorganismo diferente del microorganismo detectado.

10 En efecto, la solicitante ha puesto en evidencia que los falsos positivos podían estar relacionados con la presencia de anticuerpos dirigidos contra unos microorganismos M1 diferentes del microorganismo M2 a detectar, microorganismos M1 que, responsables de la interferencia y de los cuales se desea neutralizar la detección, presentaban una cierta identidad de secuencia peptídica con la del microorganismo M2 a detectar sobre una longitud limitada, y que la adición de los péptidos particulares correspondientes, que pertenecen a los microorganismos M1 o M2 permitían eliminar estos falsos positivos sin alterar la sensibilidad del ensayo.

15 Así, la invención se refiere a la utilización de péptidos de interferencia para bloquear los resultados falsos positivos relacionados con la presencia de anticuerpos dirigidos contra el microorganismo interferente M1, como se define en la reivindicación 1. Los péptidos de interferencia se caracterizan por que su secuencia se selecciona entre

20 (i) una secuencia peptídica S1 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 interferente, y

(ii) una secuencia peptídica S2 de 7 a 12 aminoácidos incluida en la secuencia peptídica de una proteína diana de un microorganismo M2 a detectar, diferente del microorganismo M1,

25 entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 están alineadas la una con respecto a la otra, que presentan al menos un 50% de identidad e su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presenta 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias.

30 Un objeto se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 en una muestra biológica, por la detección de al menos un anticuerpo Ab_{M2} dirigido contra una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, caracterizado por que comprende las etapas de:

35 a) disponer de al menos un par de unión a dicho al menos un anticuerpo Ab_{M2} a detectar necesario para el inmunoanálisis, procediendo dicho al menos una par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma,

b) disponer de al menos un péptido de interferencia que posee una secuencia seleccionada entre

40 - (i) una secuencia peptídica S1 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 diferente del microorganismo M2, y

- (ii) una secuencia peptídica S2 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína diana de dicho microorganismo M2 y que está incluida en la secuencia peptídica de dicho al menos un par de unión,

45 - entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 están alineadas la una con respecto a la otra, que presentan al menos un 50% de identidad en su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias,

50 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia, y

d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre el anticuerpo Ab_{M2} y la o los pares de unión.

55 Otro objeto se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 en una muestra biológica, mediante la detección de al menos una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, caracterizado por que comprende las etapas de:

60 a) disponer de al menos un par de unión de dicha al menos una proteína diana de dicho microorganismo M2, necesario para el inmunoanálisis,

b) disponer de al menos un péptido de interferencia que posee una secuencia seleccionada entre

65 - (i) una secuencia peptídica S1 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 diferente del microorganismo M2,

y

- (ii) una secuencia peptídica S2 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína diana de dicho microorganismo M2 y que está incluida en la secuencia peptídica de dicha al menos una proteína diana,

5 - entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 están alineadas la una con respecto a la otra, que presentan al menos un 50% de identidad en su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias,

10 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia, y

d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre la proteína diana y la o los pares de unión.

15 Otro objeto se refiere a un procedimiento de mejora de la especificidad de un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de un analito representativo de un microorganismo M2 a detectar en una muestra biológica, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del inmunoanálisis, de al menos un péptido de interferencia que posee una secuencia seleccionada entre

20 - (i) una secuencia peptídica S1 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 diferente del microorganismo M2, y

25 - (ii) una secuencia peptídica S2 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína diana del microorganismo M2,

entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 están alineadas la una con respecto a la otra, que presentan al menos 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias.

30 La solicitante ha mostrado, de manera inesperada, que la detección de falsos positivos, relacionados a la muestra ensayada, durante la realización de un ensayo de inmunoanálisis para la detección de un microorganismo M2 podía ser reducida, incluso eliminada, mediante la utilización de péptidos particulares, teniendo estos péptidos las características siguientes:

35 - presentan una secuencia peptídica S1 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 diferente del microorganismo M2, o presentan una secuencia peptídica S2 de 7 a 12 aminoácidos que proviene de la secuencia peptídica de una proteína diana del microorganismo M2 a detectar,

40 - las secuencias S1 y S2 están alineadas la una con respecto a la otra,

45 - las secuencias S1 y S2 presentan al menos 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos,

las secuencias S1 y S2 presentan una longitud idéntica o presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia en longitud distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias.

50 En aras de la claridad, cuando se desea generalizar, se denominará el péptido de interferencia útil para los fines de la invención como péptido de secuencia S, ya sea este péptido de secuencia S1 o S2 y por lo tanto proviene del microorganismo M1 o M2. Se denominará entonces el péptido que ha servido para el aislamiento del péptido de secuencia S, péptido de secuencia S', sabiendo que esta elección muy arbitraria en la medida en la que los dos péptidos de secuencia S1 y S2, y, por lo tanto, S y S' son utilizables y utilizados como péptido de interferencia según la invención y por lo tanto, se podría haber elegido denominar el péptido de interferencia de secuencia S1 o S2, como péptido de secuencia S'.

55 En otras palabras, los péptidos de interferencia útiles para los fines de la invención son unos péptidos de interferencia de secuencia peptídica S, de 7 a 12 aminoácidos, que provienen de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M, secuencia S que está alineada con una secuencia peptídica diferente S', de 7 a 12 aminoácidos, que proviene de la secuencia peptídica de una proteína diana de un microorganismo M' diferente del microorganismo M, entendiéndose que dichas secuencias S y S' presentan al menos un 50% de identidad en su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencias distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias.

Este péptido de secuencia S es particularmente útil para neutralizar la muestra frente al microorganismo que no se desea detectar (M o M'), microorganismo que crea unas interferencias frente al microorganismo a detectar (respectivamente M' o M). Este último microorganismo puede denominarse entonces microorganismo interferente.

5 En otras palabras, cuando el microorganismo diana a detectar es el microorganismo M, el péptido de secuencia S, procedente del microorganismo diana, sirve para neutralizar el microorganismo interferente M'. Por el contrario, cuando el microorganismo diana a detectar es el microorganismo M', el péptido de secuencia S, que procede entonces del microorganismo interferente, sirve para neutralizar el microorganismo interferente M.

10 Para mayor claridad, se designará aquí el microorganismo que se desea detectar, microorganismo M2, que representa un microorganismo M' o M, sabiendo por supuesto que esta denominación es arbitraria y que se podría haber elegido denominar este microorganismo M1.

15 En otras palabras, el péptido de interferencia de secuencia S de la invención tal como se ha definido anteriormente es útil para la detección de un microorganismo M o de un microorganismo M'.

Los microorganismos M2 (M' o M) de los cuales se desean detectar la presencia son cualquier microorganismo que conlleva una patología y del cual es necesario proceder a un diagnóstico fiable para realizar un tratamiento, un seguimiento o limitar su propagación. Los microorganismos pueden ser unos virus, unas bacterias o unas levaduras, que son bien conocidos por el experto en la materia.

20 A título de ejemplos no limitativos de virus, se pueden citar los virus de la hepatitis, tales como los virus de las hepatitis A, B, C, E y G, los virus de la inmunodeficiencia humana tales como el VIH-1 y VIH-2, los virus de Epstein-Barr (EBV), los virus de la gripe tales como H1N1 y H5N1, el citomegalovirus (CMV), el virus de la rubeola, el virus JC, etc.

A título de ejemplos no limitativos de bacterias, se pueden citar los estafilococos, tales como *Staphylococcus aureus*, los estreptococos, tales como *Streptococcus pneumoniae*, los bacilos.

30 A título de ejemplos no limitativos de levadura, se pueden citar las Candida.

Por proteína diana del microorganismo M2, se entiende una proteína codificada por el genoma de dicho microorganismo y producida durante la infección por este dicho microorganismo, que se puede detectar mediante el procedimiento de inmunoanálisis, o bien que genera una respuesta anticuerpo por parte del hospedante infectado, también detectable por el procedimiento de inmunoanálisis. Así, por ejemplo, en el ámbito del virus de la hepatitis C (VHC), las proteínas dianas pueden ser, por ejemplo, las proteínas Core, NS3, NS4 o NS5. Tratándose del virus VIH-1, se pueden citar por ejemplo las proteínas Env (gp160, gp120, gp41), Gag (p55 y sus formas procesadas maduras: la cápsida p24, la matriz p17, ...), Pol (transcriptasa inversa e integrasa), Tat, Bef, Rev. A título de otro ejemplo, se pueden citar las proteínas Emp (proteína de unión a la proteína de la matriz extracelular) o PVL (panton-valentina leucocidina) de la bacteria *Staphylococcus aureus*, o las proteínas "Ribosomal small subunit methyltransferase H", factor de elongación P, o también la chaperona DnaK de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Por supuesto, el experto en la materia conoce perfectamente las diversas proteínas dianas de los microorganismos que desea detectar.

45 Por microorganismo M1 (M o M') diferente del microorganismo M2 (respectivamente M' o M) a detectar, se entiende cualquier microorganismo que no es el microorganismo M2 en sí mismo. Los microorganismos M1 y M2 pueden ser unos microorganismos de la misma naturaleza (virus, bacterias, levaduras) y de la misma familia (por ejemplo el microorganismo M2 a detectar puede ser el virus VHC y el otro microorganismo es el virus VHB) o a otra familia (por ejemplo el virus a detectar es el virus VHC y el otro microorganismo es el virus del VIH-1). Los microorganismos M1 y M2 pueden ser unos microorganismos de naturaleza diferente (virus/bacteria, virus/levadura, bacteria/levadura). Estos microorganismos son los microorganismos que cada paciente puede encontrar y contra los cuales desarrollaría una respuesta anticuerpo.

55 Según un modo de realización, el microorganismo M2 es un virus o una bacteria. Según otro modo de realización, el microorganismo M2 es un virus y el microorganismo M1 es una bacteria, o bien el microorganismo M2 es una bacteria y el microorganismo M1 es un virus.

60 Según un modo de realización, el virus es el virus de la hepatitis C, VHC, y el microorganismo diferente del virus es una bacteria, seleccionada en particular entre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas entomophila* y *Pseudomonas putida* (cepa GB-1).

Según otro modo de realización, el virus es el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH 1, y el microorganismo diferente del virus es *Mycoplasma pneumoniae*.

65 Por proteína antigénica de un microorganismo M1 (o microorganismo interferente) diferente del microorganismo M2 a detectar, se entiende una proteína de dicho microorganismo M1 que induce a una respuesta anticuerpo por parte

del hospedante infectado, que es también el paciente en el que se ha efectuado la extracción de muestra biológica. De nuevo, el experto en la materia conoce las proteínas antigénicas de los microorganismos M1 que corresponden a las proteínas dianas tales como se han descrito anteriormente cuando se habla de detección y podría hacer la distinción fácilmente entre las proteínas de los microorganismos que son antigénicas o también denominadas dianas y las que son no antigénicas o también denominadas no dianas.

El experto en la materia sabe también que, como se ha indicado anteriormente, la diferenciación entre la expresión "proteína antigénica" y "proteína diana" sólo tiene lugar por referencia al microorganismo en el procedimiento de detección, a saber aquel del que se desea la detección (se habla entonces de proteína diana) o aquel que se desea neutralizar (se habla entonces de proteína antigénica). Por lo tanto, se deduce que estos dos términos se utilizan indiferentemente y deben comprenderse como idénticos para el péptido de interferencia en sí mismo, de secuencia S, sin referencia a su utilización.

Los péptidos de secuencia S y S', y por lo tanto de secuencia S1 o S2, según la invención presentan de 7 a 12 aminoácidos, lo que corresponde a la longitud en aminoácidos reconocida por un paratopo de un anticuerpo. Según un modo de realización, las secuencias S1 y S2 tienen de 8 a 10 aminoácidos.

Según otro modo de realización, los péptidos de interferencia de secuencia S se seleccionan entre:

- Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1, siendo el péptido de secuencia S' el péptido V7E de secuencia SEQ ID N°2,
- V7E de secuencia SEQ ID N°2, siendo el péptido de secuencia S' el péptido Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1 ,
- A8E de secuencia SEQ ID N°3, siendo el péptido de secuencia S' el péptido E8E de secuencia SEQ ID N°4,
- Y7E-2 de secuencia SEQ ID N°5, siendo el péptido de secuencia S' el péptido E8E de secuencia SEQ ID N°4,
- D8E de secuencia SEQ ID N°6, siendo el péptido de secuencia S' el péptido E8E de secuencia SEQ ID N°4,
- E8E de secuencia SEQ ID N°4, siendo el péptido de secuencia S' el péptido A8E de secuencia SEQ ID N°3 o Y7E-2 de secuencia SEQ ID N°5 o D8E de secuencia SEQ ID N°6,
- E8L-1 de secuencia SEQ ID N°7, siendo el péptido de secuencia S' el péptido E8L-2 de secuencia SEQ ID N°8, y
- E8L-2 de secuencia SEQ ID N°8, siendo el péptido de secuencia S' el péptido E8L-1 de secuencia SEQ ID N°7.

Entre estos diferentes péptidos, el péptido V7E del VHC de secuencia SEQ ID N°2 ya se ha descrito en las solicitudes de patente EP0582243A, DE4240980A1, y EP0922980A, y el péptido AA_{a2}-QHLPYIE-BBA_{b3} se ha descrito en la solicitud de patente EP0484787A. Sin embargo, estos péptidos se han descrito sólo como inmunógeno. No se han descrito jamás como péptido de interferencia útil para suprimir los falsos positivos relacionados con la muestra ensayada. Los otros péptidos son nuevos y constituyen un objeto de la invención.

Asimismo, la invención se refiere a los péptidos de interferencia siguientes: Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1, A8E de secuencia SEQ ID N°3, E8E de secuencia SEQ ID N°4, Y7E-2 de secuencia SEQ ID N°5, D8E de secuencia SEQ ID N°6 y E8L-1 de secuencia SEQ ID N°7.

Por "al menos un 50% de identidad" se entiende el hecho de que al menos la mitad de los aminoácidos de cada secuencia son idénticos o análogos, entendiéndose que estas dos secuencias presentan al menos 4 aminoácidos idénticos o análogos contiguos.

De manera general, el término "aminoácido análogo" se refiere a un aminoácido que, cuando sustituye el aminoácido nativo en la secuencia o cuando está ausente, no conlleva ninguna destrucción de la reactividad antigénica de dicha secuencia.

Los análogos particularmente preferidos incluyen las sustituciones conservadoras en la naturaleza, es decir las sustituciones que toman lugar en una familia de aminoácidos. Existen varias clasificaciones de aminoácidos en familia, como se conoce bien por el experto en la materia. Así, según un ejemplo de clasificación, los aminoácidos pueden dividirse en 4 familias, a saber (1) los aminoácidos tales como el aspartato y el glutamato, (2) los aminoácidos básicos tales como la lisina, la arginina y la histidina, (3) los aminoácidos no polares tales como la leucina, la isoleucina y la metionina y (4) los aminoácidos no cargados polares tales como la glicina, la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina son a veces clasificados en aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una relación estructural, no tendrá mayor impacto sobre la actividad biológica. Otro ejemplo de método que permite predecir el efecto sobre la actividad biológica de una sustitución de aminoácido se ha descrito por Ng y Henikoff, 2001.

Las secuencias S y S' (s1 y S2) están alineadas la una con respecto a la otra con una longitud idéntica o presenta 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias. En otras palabras, las secuencias S y S' (S1 y S2) presentan una secuencia común de al menos 7 aminoácidos, con unos aminoácidos idénticos o análogos, por sustitución conservadora o delección como se ha descrito anteriormente y, cuando su longitud es diferente, los aminoácidos además con respecto a esta secuencia común se encuentran a un extremo (1 o 2 aminoácidos), al otro (1 o 2 aminoácidos), o a los dos (1 o 2 aminoácidos) indiferentemente de cada lado. Así, si se denomina X la secuencia común, A_n un aminoácido de diferencia colocado al extremo y n un número entero de 1 a 4, las alineaciones de los péptidos de la invención se pueden representar de la siguiente manera:

<u>X</u> A ₁	A ₁ <u>X</u>	<u>X</u> A ₁ A ₂	A ₁ A ₂ <u>X</u>
<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>
A ₁ <u>X</u> A ₂	A ₁ A ₂ <u>X</u> A ₃	A ₁ <u>X</u> A ₂ A ₃	A ₁ A ₂ <u>X</u> A ₃ A ₄
<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>

El número máximo de aminoácidos de diferencia es por lo tanto de 4.

El experto en la materia determinará fácilmente las regiones de la secuencia que pueden tolerar un cambio, sin efecto mayor sobre la actividad biológica, por referencia a los plots Hopp/Woods y Kyte-Doolite, bien conocidos en la técnica.

Según un modo de realización, los aminoácidos de la secuencia común a las secuencias S y S' (S1 y S2) reúnen al menos una de las características siguientes:

- son idénticos,
- si presentan análogos, presentan como mucho 1 o 2 análogos,
- presenta como mucho 3 análogos por sustitución conservadora,
- presentan como mucho 1 o 2 análogos por delección.

Según otro modo de realización, al menos los 4 aminoácidos contiguos reúnen al menos una de las características siguientes:

- son todos idénticos o análogos por sustitución conservadora,
- cuando presentan análogos, estos últimos son como mucho en número de 1 o 2.

Según también otro modo de realización de la invención, las dos secuencias S y S' (S1 y S2) presentan al menos un 50%, preferentemente al menos un 55-60%, más preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 80-90% de identidad de secuencia sobre la longitud predefinida de las moléculas peptídicas, así como cualquier valor más allá del 50% y hasta el 100%.

Los péptidos de la invención son particularmente útiles para disminuir, incluso suprimir los falsos positivos de un procedimiento de análisis inmunológico durante la determinación de la presencia de un microorganismo M2 (M' o M) en una muestra biológica susceptible de dar unos falsos positivos, estando estos falsos positivos provocados por la presencia de anticuerpos dirigidos contra un microorganismo M1 (respectivamente M o M') diferente del microorganismo M2 (M' o M) a detectar (que se le denominará Ab_{M1} o respectivamente Ab_M o Ab_{M'}).

Para realizar la detección de la presencia del microorganismo M2 (M' o M) a detectar, se utiliza o bien la detección de al menos un anticuerpo dirigido contra una proteína diana del microorganismo M2 a detectar (anticuerpo que se denominará Ab_{M2} o respectivamente Ab_{M'} o Ab_M), o bien a la detección de al menos una proteína diana tal como se ha descrito anteriormente, o bien las dos. Se habla entonces en este último caso de un procedimiento en combinación o procedimiento combo.

Cuando el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 (M' o M) en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos un anticuerpo Ab_{M2} dirigido contra una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

a) disponer de al menos un par de unión a dicho al menos un anticuerpo Ab_{M2} a detectar necesario para el inmunoanálisis, procediendo dicho al menos un par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma,

5 b) disponer de al menos un péptido de interferencia tal como se ha definido anteriormente, entendiéndose que la secuencia S1 pertenece al microorganismo M1 diferente del microorganismo M2 a detectar y la secuencia S2 está incluida en la secuencia peptídica de dicho al menos un par de unión,

10 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia, y

d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre el anticuerpo Ab_{M2} y el o los pares de unión.

15 Cuando el microorganismo M2 a detectar es el microorganismo al que pertenece el péptido de secuencia S (es por lo tanto el microorganismo M), el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos un anticuerpo Ab_M dirigido contra una proteína diana del microorganismo M a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

20 a) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S tal como se ha definido anteriormente,

b) disponer de al menos un par de unión a dicho al menos un anticuerpo Ab_M a detectar necesario para el inmunoanálisis, procediendo dicho al menos un par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma, y que incluye la secuencia peptídica S,

25 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S, y

d) detectar la presencia del microorganismo M midiendo el complejo formado entre el anticuerpo Ab_M y el o los pares de unión.

30 Cuando el microorganismo M2 a detectar no es el microorganismo al que pertenece el péptido de secuencia S, sino el microorganismo al que pertenece la secuencia S' (es por lo tanto el microorganismo M'), el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M' en un muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos un anticuerpo $Ab_{M'}$ dirigido contra una proteína diana del microorganismo M' a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

35 a) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S tal como se ha definido anteriormente,

40 b) disponer de al menos un par de unión a dicho al menos un anticuerpo $Ab_{M'}$ a detectar necesario para el inmunoanálisis, procediendo dicho al menos un par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma, y que incluye la secuencia peptídica S' tal como se ha definido anteriormente,

45 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S, y

d) detectar la presencia del microorganismo M' midiendo el complejo formado entre el anticuerpo $Ab_{M'}$ y el o los pares de unión.

50 Mediante la expresión "procediendo dicho al menos un par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma", se entiende que el par de unión es la proteína diana tal como se ha descrito anteriormente, o bien un fragmento de esta capaz de unirse a los anticuerpos de la muestra a evaluar.

55 Cuando el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 (M' o M) en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

a) disponer de al menos un par de unión de dicha al menos una proteína diana de dicho microorganismo M2 necesario para el inmunoanálisis,

60 b) disponer de al menos un péptido de interferencia tal como se ha definido anteriormente, entendiéndose que la secuencia S1 pertenece al microorganismo M1 diferente del microorganismo M2 a detectar y la secuencia S2 está incluida en la secuencia peptídica de dicha al menos una proteína diana,

65 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia, y

d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre la proteína diana y el o los pares de unión.

5 Cuando el microorganismo M2 a detectar es el microorganismo al que pertenece el péptido de secuencia S (es por lo tanto el microorganismo M), el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos una proteína diana del microorganismo M a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

10 a) disponer de al menos un par de unión de dicha al menos una proteína diana de dicho microorganismo M necesario para el inmunoanálisis,

b) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia S tal como se ha definido anteriormente, secuencia S que está incluida en la secuencia peptídica de dicha al menos una proteína diana,

15 c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia S, y

d) detectar la presencia del microorganismo M midiendo el complejo formado entre la proteína diana y el o los pares de unión.

20 Cuando el microorganismo M2 a detectar no es el microorganismo al que pertenece el péptido de secuencia S, sino el microorganismo al que pertenece la secuencia S' (es por lo tanto el microorganismo M'), el procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M' en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos una proteína diana del microorganismo M' a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:

25 a) disponer de al menos un par de unión de dicha al menos una proteína diana de dicho microorganismo M' necesario para el inmunoanálisis,

30 b) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia S tal como se ha definido anteriormente, entendiéndose que la secuencia S' correspondiente está incluida en la secuencia peptídica de dicha al menos una proteína diana,

c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia S, y

35 d) detectar la presencia del microorganismo M' midiendo el complejo formado entre la proteína diana y el o los pares de unión.

40 Como par de unión a la proteína diana a buscar, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, las nanofitinas, los receptores de este antígeno o cualquier otra proteína conocida por tener una interacción con la proteína diana a buscar.

Los anticuerpos pares de unión son, por ejemplo, unos anticuerpos policlonales o bien unos anticuerpos monoclonales.

45 Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con la proteína diana o con la partícula viral inactivada y/o fraccionada si el microorganismo M2 (M' o M) es un virus, o también con un lisado bacteriano o un extracto de proteínas bacterianas si el microorganismo M2 (M' o M) es una bacteria, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual e fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular dicha proteína diana.

50 Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante la técnica de los hibridomas cuyo principio general se recuerda a continuación.

55 En primer lugar, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, con la proteína diana de interés o con la partícula viral inactivada y/o fraccionada si el microorganismo M2 (M' o M) es un virus, o también con un lisado bacteriano o un extracto de proteínas bacterianas si el microorganismo M2 (M' o M) es una bacteria, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan después con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a dicha proteína diana podrán ensayarse, por ejemplo, en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican después, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad

descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden también ser unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

5 A título de ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, así como las cadenas scFv (Single chain variable fragment), DsFv (Double-stranded variable fragment). Estos fragmentos funcionales pueden obtenerse en particular por ingeniería genética.

10 Las nanofitinas (nombre comercial) son pequeñas proteínas que, como los anticuerpos, son capaces de unirse a una diana biológica, permitiendo así detectarlas, capturarlas o muy simplemente determinarlas dentro de un organismo.

15 Independientemente de si se detecta una proteína y/o un anticuerpo, también denominado analito representativo del microorganismo M2 (M' o M) a detectar, los pares de unión tienen en común que pueden ser específicos o no del analito a detectar. Se denominan específicos cuando son capaces de unirse de manera exclusiva o casi exclusiva a estos analitos. Se denominan no específicos cuando la selectividad de unión a estos analitos es baja y que son entonces capaces de unirse a otros ligandos, tales como otras proteínas o anticuerpos. Según un modo de realización preferido, se prefieren los pares de unión específicos.

20 Estos pares de unión específicos o no de los analitos buscados en el procedimiento de la invención se pueden utilizar como reactivo de captura, como reactivo de detección, o como reactivos de captura y de detección en el ámbito del inmunoanálisis realizado.

25 Por supuesto, el término "inmuno" en "inmunoanálisis" por ejemplo, no debe considerarse en la presente solicitud como indicando estrictamente que el par de unión es un par inmunológico, tal como un anticuerpo. En efecto, el experto en la materia utiliza también ampliamente este término cuando el par de unión, también denominado ligando, no es un par inmunológico, sino es, por ejemplo, un receptor del analito que se desea analizar. Así, se conoce hablar del análisis ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para unos análisis que utilizan unos pares de unión no inmunológicos, denominados más ampliamente en inglés "Ligand Binding Assay", que se podría traducir por "Análisis que utiliza la unión a un ligando", mientras que el término "inmuno" está incluido en el acrónimo ELISA. Para más claridad, la solicitante utilizará en toda la solicitud el término "inmuno" para cualquier análisis que utiliza un par de unión, incluso cuando no es un par inmunológico.

35 La realización del inmunoanálisis es una etapa ampliamente conocida por el experto en la materia que adapta su ensayo en función del microorganismo M2 (M' o M) a detectar y de los pares de unión a utilizar.

40 Durante este procedimiento, se añadirán uno o varios péptidos de la invención y el experto en la materia adaptará las condiciones del ensayo en consecuencia. El procedimiento de inmunoanálisis comprenderá preferentemente la utilización de uno, dos, tres o cuatro péptidos de interferencia según la invención.

45 El o los péptidos de interferencia se añadirán a la muestra biológica a analizar antes de empezar el inmunoanálisis o en una cualquiera de las etapas de reacción antígeno-anticuerpo del inmunoanálisis. En el caso de una inmunoanálisis en una etapa, los péptidos de interferencia estarán presentes o se añadirán cuando la muestra biológica reaccione con la fase de captura. En el caso de una inmunoanálisis en 2 etapas, los péptidos de interferencia se añadirán durante la captura o durante la revelación o en ambos casos. En todos los casos, los péptidos de interferencia se añadirán antes de la etapa de revelación (adición del sustrato y visualización o detección de la señal).

50 La detección de la presencia del microorganismo M2 (M' o M) midiendo el complejo formado entre el analito y los pares de unión se puede realizar mediante cualquier método de visualización de un inmunoanálisis conocido por el experto en la materia, tal como unos medios directos o indirectos.

55 En el caso de la detección directa, es decir sin el intermediario de un marcado, se observan las reacciones inmunológicas por ejemplo por resonancia plasmónica de superficie o por voltametría cíclica sobre un electrodo que lleva un polímero conductor.

La detección indirecta se realiza por medio de un marcado, o bien del par de unión denominado reactivo de detección, o bien de la proteína diana en sí misma o de uno o varios de sus fragmentos.

60 Por marcado, se entiende la fijación de un reactivo capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos reactivos marcadores consiste en:

* las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,

65 * los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,

* las moléculas radioactivas como el ³²P, el ³⁵S o el ¹²⁵I,

* las moléculas fluorescentes tales como Alexa o ficocianinas.

5 También se pueden utilizar unos sistemas indirectos de detección, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Los pares ligando/anti-ligando son bien conocidos por el experto en la materia, lo que es el caso, por ejemplo, de los pares siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando que
10 lleva el par de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los reactivos marcadores descritos en el párrafo anterior o ser el mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la solicitante o al artículo de Chevalier *et al.*,
15 1997.

Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permiten la visualización del marcado o la emisión de una señal detectable mediante cualquier tipo de aparato de medición como, por ejemplo, un
20 espectrofotómetro, un espectrofluorímetro, o también una cámara de alta definición.

La muestra biológica en la que el procedimiento de la invención se puede utilizar es cualquier muestra biológica susceptible de contener un analito representativo de un microorganismo (antígeno, anticuerpo), en el que se puede llevar a cabo un inmunoanálisis. Estas muestras son ampliamente conocidas por el experto en la materia. A título de
25 ejemplo de tales muestras, se pueden citar los fluidos biológicos tales como suero, plasma, sangre, sangre total, orina, líquido cefalorraquídeo, pero también tejido, heces u otros. Las muestras biológicas provienen de cualquier animal para el cual es necesario detectar la presencia de un microorganismo patógeno, tal como mamíferos, incluyendo el ser humano, los ovinos, los bovinos, los caprinos, los caninos, los peces y las especies aviarias. La solicitante ha mostrado, de manera inesperada, que estas muestras son también susceptibles de contener unos
30 anticuerpos Ab_{M1} dirigidos contra un microorganismo diferente del microorganismo M2 a detectar y que son estos anticuerpos los que conducen a unos resultados falsamente positivos del ensayo.

La muestra biológica puede tratarse en una etapa previa. Por ejemplo, se pueden utilizar unas condiciones ácidas, que favorecen la exposición de los antígenos a detectar. Se pueden utilizar unos detergentes de tipo iónico o no
35 iónico por ejemplo el triton X100 o el SDS (sulfato dodecil sódico) o unos derivados de poli(oxietileno) como el NP40.

La utilización de los péptidos de la invención es por lo tanto particularmente útil en todos los procedimientos de inmunoanálisis. Asimismo, otro objeto de la invención se refiere a la utilización de un péptido de interferencia de
40 secuencia S tal como se ha definido anteriormente en un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de un analito representativo de un microorganismo a detectar en una muestra biológica.

La utilidad de los péptidos de la invención reside en la supresión de los falsos positivos, mejorando así la especificidad de un ensayo, otro objeto se refiere a un procedimiento de mejora de la especificidad de un
45 procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de un analito representativo de un microorganismo a detectar en una muestra biológica, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del inmunoanálisis, de al menos un péptido de interferencia de secuencia S tal como se ha definido anteriormente.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 a 4, en las que:

- 50 - la figura 1 muestra la alineación entre el péptido V7E-1 de VHC y el péptido Y7E-1 de *Staphylococcus aureus*,
- la figura 2 muestra la alineación entre el péptido E8E de VHC y el péptido A8E de *Streptococcus pneumoniae* (Fig 2A), el péptido Y7E-2 de *Bacillus subtilis* (Fig 2B) y el péptido D8E de *Pseudomonas entomophila* o de
55 *Pseudomonas putida* (cepa GB-1) (Fig 2C),
- la figura 3 muestra la alineación entre el péptido E8L-2 de VIH-1 y el péptido E8L-1 de *Mycoplasma pneumoniae*, y
- la figura 4 muestra la alineación entre el péptido E8E de VHC y el péptido A6M de *Streptococcus pneumoniae*.

60 En las figuras, “ . ” representa una identidad de aminoácido con respecto al aminoácido presente en la misma posición por encima, y “-” representa una deleción en una posición dada.

Ejemplo 1: Péptidos de interferencia Y7E-1 (*Staphylococcus aureus*) y V7E (VHC)

65

A fin de mejorar la especificidad de los inmunoanálisis que permiten diagnosticar una infección por VHC o por *Staphylococcus aureus*, se han definido dos péptidos de interferencia según la invención.

5 El péptido Y7E-1 tiene por secuencia peptídica YSPHYVPE (SEQ ID°1), que corresponde a los aminoácidos 322-330 de la proteína "Proteína de unión a la proteína de la matriz extracelular Emp" de *Staphylococcus aureus* (número de acceso Q8NXI8 de la base de datos UniProtKB). Este péptido Y7E se alinea con el péptido VHC V7E cuya secuencia peptídica es VSPHYVPE (SEQ ID°2) y que corresponde a los aminoácidos 218-226 de la proteína NS4B du VHC (numeración según la secuencia de referencia RefSeq NCBI, el número de acceso es NP_751926).

10 La alineación de los péptidos Y7E-1 y V7E se representa en la figura 1. Los péptidos Y7E-1 y V7E tienen una identidad del 89% para una longitud común de 9 aminoácidos.

Ejemplo 2: Péptidos de interferencias E8E (VHC) y A8E (*Streptococcus pneumoniae*), Y7E-2 (*Bacillus subtilis*) y D8E (*Pseudomonas entomophila* o *putida* cepa GB-1)

15 A fin de mejorar la especificidad de los inmunoanálisis que permiten diagnosticar una infección por VHC, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, o *Pseudomonas entomophila* o *putida* cepa GB-1, se han definido varios péptidos de interferencia según la invención.

20 El péptido A8E tiene por secuencia peptídica AQKRLAPYIE (SEQ ID°3), que corresponde a los aminoácidos 64-73 de la proteína "Ribosomal small subunit methyltransferase H" de *Streptococcus pneumoniae* (número de acceso C1CPL0 de la base de datos UniProtKB). Este péptido se alinea con el péptido VHC E8E cuya secuencia peptídica es ECSQHLPYIE (SEQ ID°4) y que corresponde a los aminoácidos 53-54 de la proteína NS4A del VHC (NP_751925) fusionados a los aminoácidos 1-8 de la proteína NS4B del VHC (NP_751926). La alineación de los péptidos A8E y E8E se presenta en la figura 2A. Los péptidos A8E y E8E tienen una identidad del 50% para una longitud común de 10 aminoácidos.

30 Unos péptidos de otros microorganismos que *Streptococcus pneumoniae* pueden también estar alineados con el péptido VHC E8E de la invención. El péptido Y7E-2 tiene por secuencia peptídica YFQHYPYIE (SEQ ID°5), que corresponde a los aminoácidos 84-92 de la proteína "Methionine-binding lipoprotein metQ" de *Bacillus subtilis* (número de acceso O32167 de la base de datos UniProtKB). La alineación de los péptidos Y7E-2 y E8E se representa en la figura 2B. Los péptidos Y7E-2 y E8E tienen una identidad del 55% para una longitud común de 9 aminoácidos.

35 El péptido D8E tiene por secuencia peptídica DIDAVLPYIE (SEQ ID°6), que corresponde a los aminoácidos 97-106 de la proteína "Elongation factor P" de *Pseudomonas entomophila* (número de acceso Q1ID35 de la base de datos UniProtKB) y de *Pseudomonas putida* (cepa GB-1) (número de acceso BOKUN5 de la base de datos UniProtKB). La alineación de los péptidos D8E y E8E se representa en la figura 2C. Los péptidos D8E y E8E tienen una identidad del 50% para una longitud común de 10 aminoácidos.

Ejemplo 3: Péptidos de interferencias E8L-1 (*Mycoplasma pneumoniae*) y E8L-2 (VIH-1)

45 A fin de mejorar la especificidad de los inmunoanálisis que permiten diagnosticar una infección por VIH-1 o por *Mycoplasma pneumoniae*, se han definido unos péptidos de interferencia según la invención.

50 El péptido E8L-1 tiene por secuencia peptídica EAYRKEQQLL (SEQ ID°7), que corresponde a los aminoácidos 200-209 de la proteína "tRNA (guanina-N(1)-)metiltransferasa" de *Mycoplasma pneumoniae M129* (número de acceso P75132 de la base de datos UniProtKB). Este péptido se alinea con el péptido VIH-1 E8L-2 cuya secuencia peptídica es ERYLKDQQLL (SEQ ID°8) y que corresponde a los aminoácidos 584-593 de la glicoproteína de cubierta gp160 del VIH-1 (numeración según la secuencia de referencia RefSeq NCBI, el número de acceso es NP_057856). La posición exacta puede variar de una cepa de VIH-1 a otra, dada la gran variabilidad genética de este virus. La alineación de los péptidos E8L-1 y E8L-2 se presenta en la figura 3. Los péptidos E8L-1 y E8L-2 tienen una identidad del 70% para una longitud de 10 aminoácidos.

Ejemplo 4: Mejora de la especificidad de un inmunoanálisis de los anticuerpos anti-VHC por utilización de péptidos de interferencia según la invención

60 El diagnóstico de una infección por el virus de la hepatitis C se lleva a cabo actualmente utilizando los inmunoanálisis que son unos ensayos serológicos inmuno-enzimáticos de 3ª generación y que ponen en evidencia unos anticuerpos dirigidos contra las proteínas Core, NS3, y NS4, y NS5 para algunos ensayos. Estos anticuerpos anti-VHC detectados son testigos de una infección actual o pasada.

65 Los ensayos serológicos inmuno-enzimáticos que permiten poner en evidencia unos anticuerpos anti-virus pueden realizarse en microplaca, de manera automatizada o manual, o también utilizando unos autómatas de inmunoanálisis como VIDAS® (bioMérieux). En este caso, todas las etapas del ensayo se realizan automáticamente por el instrumento. Las diferentes técnicas inmuno-enzimáticas y en particular ELISA son bien conocidas por el

experto en la materia y los principios fundamentales, así como los ejemplos de protocolo, se describen en el libro "The ELISA Guidebook", segunda edición, por John R. Crowther, ediciones Humana Press (DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4).

5 El cono (SPR[®]) de uso único sirve al mismo tiempo de fase sólida y de sistema de pipeteado. La superficie del cono está recubierta de unos antígenos para la detección de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas Core, NS3 y NS4 de VHC. En una primera etapa, la muestra se diluye, después se aspira y se expulsa dentro del cono. Los anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra se fijarán a los antígenos presentes en el interior del cono. Unas etapas de lavado eliminan los compuestos no fijados. Durante la segunda etapa de las IgG monoclonales (ratones) anti-inmunoglobulinas (anti-IgG) humanas en forma Fab' conjugadas a la fosfatasa alcalina recombinante se aspiran y expulsan dentro del cono y se unirán a las Ig humanas anti-VHC procedentes de la muestra ensayada, fijadas sobre los antígenos de la fase sólida. De nuevo, unas etapas de lavado eliminan los compuestos no fijados. Durante la etapa final de revelación, el sustrato (4-metilumbelliferil fosfato) se aspira y después se expulsa en el cono; la enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-metilumbeliferona) cuya fluorescencia emitida se mide a 450 nm. El valor de la señal de fluorescencia es proporcional a la concentración del anticuerpo presente en la muestra. Al final del ensayo, los resultados se calculan automáticamente en forma de un índice por el instrumento dividiendo el valor obtenido por el valor del estándar S1 llevado a 1 (valor memorizado en el instrumento). Así, una muestra cuyo índice es superior o igual a 1 se considera como positiva por el ensayo inmuno-enzimático (presencia de anticuerpo anti-VHC) y una muestra cuyo índice es inferior a 1 se considera como negativa (ausencia de anticuerpo anti-VHC). En los párrafos siguientes, este modo de realización del análisis de los anticuerpos-VHC se denominará "Modo de Realización 1", que corresponde al análisis de los anticuerpos anti-VHC sin péptido de interferencia.

25 A fin de disminuir las interferencias relacionadas con un reconocimiento no específico de los antígenos del Modo de Realización 1 para la detección de los anticuerpos anti-NS4, debido a unos elementos contenidos en las muestras ensayadas, se han utilizado diferentes péptidos de interferencia definidos en los ejemplos 1 y 2. Se trata de péptidos que pertenecen o bien al virus a detectar (utilización de un péptido de secuencia S de la invención para la detección de un microorganismo M), o bien a un microorganismo diferente del virus a detectar (utilización de un péptido de secuencia S de la invención para la detección de un microorganismo M'). Estos péptidos se produjeron por síntesis química según los procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, tal como la síntesis peptídica en fase sólida descrita por Merrifield, 1962 y Fields y Noble, 1990, utilizando un polímero de tipo poliestireno que contiene 0,1-1,0 mMol aminas/g de polímero. Al final de la síntesis química, los péptidos se pueden desproteger y escindir del polímero en presencia de una mezcla de ácido trifluoroacético-etanoditiol-triisopropilsilano-agua (94/2,5/1/2,5 V/V/V/V) durante aproximadamente 2 horas. Después de la eliminación del polímero, los péptidos se extraen por precipitación en éter dietílico a 0°C. Se pueden purificar por unas técnicas tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento. La liofilización de las fracciones de purificación apropiadas conduce a un péptido homogéneo que podrá caracterizarse mediante unas técnicas fisicoquímicas estándar tales como la espectrometría de masas, la cromatografía líquida de alto rendimiento, el análisis de aminoácidos.

40 Varios centenares de muestras de suero, negativas frente a la infección VHC y que provienen de los centros de transfusión sanguíneo de Rhône-Alpes, se han cribado a fin de identificar las muestras que planteaban un problema de interferencia. Para hacer esto, las muestras se analizaron según el Modo de Realización 1 utilizando el dispositivo automatizado VIDAS. Sólo se seleccionaron los sueros positivos según el Modo de Realización 1 (índice ≥ 1).

45 Tal discordancia entre el resultado del Modo de Realización 1 y el del estatuto negativo establecido por los centros de transfusión sanguínea permite seleccionar los sueros falsamente positivos, que plantean un problema de interferencia.

50 A fin de mostrar que la utilización de péptidos de interferencia según la invención no altera la sensibilidad del ensayo, se ha procedido también al análisis de una muestra control positivo C1 procedente de un pool de suero del mercado (TRINA BIOREACTIVES AG).

55 La tabla 1 presenta, para 7 sueros que plantean un problema de interferencia y para el control positivo C1, los resultados del análisis realizado según el "Modo de Realización 1" con o sin la presencia del péptido V7E (SEQ ID²), o del péptido Y7E (SEQ ID¹). Estos péptidos se añadieron a una concentración de 5 µg/ml durante la primera etapa del protocolo de ensayo inmuno-enzimático que corresponde a la dilución de la muestra a ensayar y su incubación con los antígenos presentes en la fase sólida.

60

Tabla 1

	Modo de realización 1	Modo de realización 1 + V7E	Modo de realización 1 + Y7E
Muestras con interferencia	Índices $\text{pos} \geq 1$		
175 1811	1,44	0,49	0,47
498	1,65	0,35	0,14
F53 3009	1,19	0,39	0,32
M43	1,73	0,42	0,17
H48	7,12	1,17	0,88
801 1409	1,91	1,04	0,71
284 2408	2,33	1,51	0,86
Control positivo	Índices $\text{pos} \geq 1$		
C1	3,02	3,06	3,02

5 La adición del péptido Y7E durante el análisis permite neutralizar totalmente la interferencia en todos los sueros. El péptido V7E permite, por su parte, neutralizar la interferencia en 4/7 de los sueros. Además, la sensibilidad del ensayo no se altera con la utilización de los péptidos de interferencia.

10 De la misma manera, la tabla 2 presenta para otros 2 sueros que plantean un problema de interferencia y para el control positivo, los resultados de análisis realizados según el Modo de Realización 1 del protocolo de detección de los anticuerpos anti-VHC, con o sin la presencia del péptido E8E (SEQ ID°4), del péptido A8E (SEQ ID°3), o también del péptido A6M (SEQ ID°9). Estos péptidos se añadieron a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante la primera etapa del protocolo de ensayo inmuno-enzimático, que corresponde a la dilución de la muestra a ensayar, y su incubación con los antígenos presentes en la fase sólida.

15 El péptido A6M cuya secuencia peptídica es APYIEKGM (SEQ ID°9) es también un péptido de *Streptococcus pneumoniae* que corresponde a los aminoácidos 69-76 de la proteína "Ribosomal small subunit methyltransferase H" de (número de acceso C1CPL0 de la base de datos UniProtKB). Este péptido no es un péptido de interferencia según la invención ya que no responde a la definición de la alineación tal como se reivindica (véase la figura 4). En efecto, incluso si este péptido presenta 4 aminoácidos contiguos idénticos al péptido E8E del VHC y es de una longitud de 8 aminoácidos, su secuencia no está alineada con respecto a la de E8E. Como tal, este péptido A6M se utiliza como control negativo en el experimento presentado en la tabla 2.

Tabla 2

	Modo de realización 1	Modo de realización 1 + E8E	Modo de realización 1 + A8E	Modo de realización 1 + A6M
Muestras con interferencia	Índice	Índice	Índice	Índice
F25	4,32	0,85	0,41	2,90
295	1,02	0,90	0,95	1,04
Control positivo	índices $\text{pos} \geq 1$			
C1	3,03	2,92	3,02	3,05

25 La adición del péptido E8E o también del péptido A8E durante el análisis permite neutralizar totalmente la interferencia en 2/2 de los sueros. El péptido A6M, que no es un péptido según la invención, no permite neutralizar la interferencia, y eso en ninguno de los sueros. De nuevo, la sensibilidad del ensayo no se altera.

30 Referencias bibliográficas

Chevalier *et al.*, 1997, J Histochem Cytochem, 45, 481-491

Kricka LJ, 1999, Clinical Chemistry 45(7): 942-956

Fields GB, Noble RL., 1990, Int J Pept Protein Res., 35(3):161-214

5

Merrifield, 1962, J. Am. Chem. Soc. 85:2149

Ng y Henikoff, 2001, Genome Res 11: 863-874

10

Tate J y Ward G, 2004, Clin Biochem Rev, 25: 105-120

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

15 <120> Péptidos de interferencia y procedimiento de detección de microorganismos

<130> CSPECIF

<150> FR12 52142

<151> 2012-03-09

<160> 9

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

25

<213> stafilococos

<400> 1

Tyr Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
1 5

<210> 2

30

<211> 9

<212> PRT

<213> VHC

<400> 2

Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Estreptococos

40

<400> 3

Ala Gln Lys Arg Leu Ala Pro Tyr Ile Glu
1 5 10

<210> 4

<211> 10

45

<212> PRT

<213> VHC

<400> 4

Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu
1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Bacilos

<400> 5

50

Tyr Phe Gln His Ile Pro Tyr Leu Glu

55

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

60

<213> Pseudomonas

<400> 6

```

    Asp Ile Asp Ala Val Leu Pro Tyr Ile Glu
    1             5             10

<210> 7
<211> 10
5 <212> PRT
  <213> Micoplasma
  <400> 7
  Glu Ala Tyr Arg Lys Glu Gln Gln Leu Leu
  1             5             10

10 <210> 8
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> VIH
   <400> 8
   Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
15  1             5             10

   <210> 9
   <211> 8
   <212> PRT
20 <213> estreptococos
   <400> 9
   Ala Pro Tyr Ile Glu Lys Gly Met
   1             5

```

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un péptido de interferencia de secuencia peptídica S1 o S2, de 7 a 12 aminoácidos, la secuencia S1 que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 interferente y estando la secuencia peptídica S2 incluida en la secuencia peptídica de una proteína diana de un microorganismo M2 a detectar, diferente del microorganismo M1, secuencias S1 y S2 las cuales están alineadas la una con respecto a la otra, entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 presentan al menos un 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias, en un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de un analito representativo del microorganismo M2 a detectar en una muestra biológica, siendo dicho analito dicha proteína diana del microorganismo M2 del cual procede la secuencia S2 o un anticuerpo dirigido contra esta proteína, para bloquear los falsos positivos relacionados con la presencia de anticuerpos dirigidos contra el microorganismo interferente M1, presentes en dicha muestra biológica.
2. Procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 en una muestra biológica que comprende o que consiste en la detección de al menos un anticuerpo Ab_{M2} dirigido contra una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:
- a) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica de secuencia S1 o S2, de 7 a 12 aminoácidos, la secuencia peptídica S1 que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 interferente y estando la secuencia peptídica S2 incluida en la secuencia peptídica de la proteína diana del microorganismo M2 a detectar, secuencias S1 y S2 las cuales están alineadas la una con respecto a la otra, entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 presentan al menos un 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias,
- b) disponer de al menos un par de unión a dicho al menos un anticuerpo Ab_{M2} a detectar necesario para el inmunoanálisis, procediendo dicho al menos un par de unión de dicha proteína diana contra la cual se dirige el anticuerpo o siendo la proteína diana en sí misma, y que incluye la secuencia peptídica S2,
- c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S1 o S2 para bloquear los resultados falsos positivos relacionados con la presencia de anticuerpos Ab_{M1} presentes en dicha muestra biológica, y
- d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre el anticuerpo Ab_{M2} y el o los pares de unión.
3. Procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de la presencia de un microorganismo M2 en una muestra biológica comprende o consiste en la detección de al menos una proteína diana del microorganismo M2 a detectar, dicho procedimiento comprende o consiste en las etapas de:
- a) disponer de al menos un par de unión de dicha al menos una proteína diana de dicho microorganismo M2 necesario para el inmunoanálisis,
- b) disponer de al menos un péptido de interferencia de secuencia peptídica S1 o S2, de 7 a 12 aminoácidos, la secuencia peptídica S1 que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 interferente y estando la secuencia peptídica S2 incluida en la secuencia peptídica de la proteína diana del microorganismo M2 a detectar, secuencias S1 y S2 las cuales están alineadas la una con respecto a la otra, entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 presentan al menos un 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias
- c) realizar el inmunoanálisis en presencia de dicho al menos un péptido de interferencia de secuencia S1 o S2 para bloquear los resultados falsos positivos relacionados con la presencia de anticuerpos Ab_{M1} presentes en dicha muestra biológica, y
- d) detectar la presencia del microorganismo M2 midiendo el complejo formado entre la proteína diana y el o los pares de unión.
4. Procedimiento de mejora de la especificidad de un procedimiento de detección *in vitro* por inmunoanálisis de un analito representativo de un microorganismo M2 a detectar, en una muestra biológica, siendo el analito una proteína diana del microorganismo M2 o un anticuerpo dirigido contra esta proteína diana, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del inmunoanálisis, de al menos un péptido de secuencia peptídica S1 o S2, la secuencia peptídica S1 que proviene de la secuencia peptídica de una proteína antigénica de un microorganismo M1 interferente y estando la secuencia peptídica S2 incluida en la secuencia peptídica de la proteína diana del

- 5 microorganismo M2 a detectar, diferente del microorganismo M1, secuencias S1 y S2 las cuales están alineadas la una con respecto a la otra, entendiéndose que dichas secuencias S1 y S2 presentan al menos un 50% de identidad sobre su longitud de 7 a 12 aminoácidos y al menos 4 aminoácidos contiguos idénticos o análogos, que su longitud es idéntica o que presentan 1 o 2 aminoácidos de diferencia distribuidos en uno y/u otro extremo de dichas secuencias, para bloquear los resultados falsos positivos relacionados con la presencia de anticuerpos dirigidos contra el microorganismo interferente M1, presentes en dicha muestra biológica.
- 10 5. Utilización o procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que las secuencias S1 y S2 tienen de 8 a 10 aminoácidos.
- 15 6. Utilización o procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el microorganismo M2 a detectar es una bacteria y el microorganismo interferente M1 es un virus.
7. Utilización o procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el microorganismo M2 a detectar es un virus y el microorganismo interferente M1 es una bacteria.
- 20 8. Utilización o procedimiento según una de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que el virus es el virus de la hepatitis C (VHC).
9. Utilización o procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que el microorganismo diferente del virus VHC se selecciona entre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas entomophila* y *Pseudomonas putida* (cepa GB-1).
- 25 10. Utilización o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los péptidos de secuencia S1 y S2 se seleccionan entre Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1, V7E de secuencia SEQ ID N°2, A8E de secuencia SEQ ID N°3, Y7E-2 de secuencia SEQ ID N°5, D8E de secuencia SEQ ID N°6 y E8E de secuencia SEQ ID N°4.
- 30 11. Utilización o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que los péptidos de secuencia S1 y S2 son respectivamente Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1 y V7E de secuencia SEQ ID N°2.
- 35 12. Utilización o procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que el virus a detectar es el virus de la inmunodeficiencia humana VIH 1.
13. Utilización o procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que el microorganismo diferente del virus a detectar es *Mycoplasma pneumoniae*.
- 40 14. Utilización o procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que los péptidos de secuencias S1 y S2 se seleccionan entre E8L-1 de secuencia SEQ ID N°7 y E8L-2 de secuencia SEQ ID N°8.
15. Péptido Y7E-1 de secuencia SEQ ID N°1
- 45 16. Péptido A8E de secuencia SEQ ID N°3.
17. Péptido E8E de secuencia SEQ ID N°4.
18. Péptido Y7E-2 de secuencia SEQ ID N°5.
- 50 19. Péptido D8E de secuencia SEQ ID N°6.
20. Péptido E8L-1 de secuencia SEQ ID N°7.

Figura 1

Y7E-1	YSPTHYVPE (SEQ°ID :1)	<i>Staphylococcus aureus</i>
V7E	V..... (SEQ°ID :2)	VHC

Figura 2

A

A8E	AQKRLAPYIE (SEQ°ID :3)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
E8E	ECSQH.-..... (SEQ°ID :4)	VHC

B

Y7E-2	YFQHIPPYLE (SEQ°ID :5)	<i>Bacillus subtilis</i>
E8E	ECS..L..I. (SEQ°ID :4)	VHC

C

D8E	DIDAVLPYIE (SEQ°ID :6)	<i>Pseudomonas entomophila ou putida</i>
E8E	ECSQH..... (SEQ°ID :4)	VHC

Figura 3

E8L-1	EAYRKEQQLL (SEQ°ID :7)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
E8L-2	.R.L.D..... (SEQ°ID :8)	VIH

Figura 4

E8E	ECSQHLPYIE (SEQ°ID :4)	VHC
A6M	A....KGM (SEQ°ID :9)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>