(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
8 de diciembre de 2016 (08.12.2016)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/193514 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 5/027 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070390

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de mayo de 2016 (24.05.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 201530780 3 de junio de 2015 (03.06.2015) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (CIBER)** [ES/ES]; C/ Monforte de Lemos, 5, 28029 Madrid (ES).

(72) Inventores: **MARCO COLÁS, M. Pilar**; Instituto De Quimica Avanzada De Cataluña (IQAC), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES). **PASCUAL DURAN, Nuria**; Instituto De Quimica Avanzada De Cataluña (IQAC), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES). **PASTELLS DÍEZ, Carme**; Instituto De Quimica Avanzada De Cataluña (IQAC), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

WO 2016/193514 A1

(54) **Title**: PEPTIDES DERIVED FROM *S. AUREUS* PEPTIDOGLYCAN AND USE THEREOF AS HAPTENS IN A DETECTION METHOD

(54) **Título** : PÉPTIDOS DERIVADOS DEL PEPTIDOGLICANO DE 5. AUREUS Y SU USO COMO HAPTENOS EN UN MÉTODO DE DETECCIÓN.

(57) **Abstract**: The invention relates to compounds derived from the bacterial wall of *Staphylococcus aureus* for use as haptens, to applications and methods thereof for detecting *S. aureus*, and to the antibodies and antisera generated for use.

(57) **Resumen**: La presente invención se refiere a compuestos derivados de la pared bacteriana de *Staphylococcus aureus* para su uso como haptenos,a sus aplicacionesy métodos para la detección de *S. aureus*, así como a losanticuerpos y antisueros generados parasu utilización.

Péptidos derivados del peptidoglicano de 5. aureus y su uso como haptenos en un método de detección.

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos derivados de la pared bacteriana de *Staphylococcus aureus* para su uso como haptenos. Además la invención se refiere a los haptenos y sus conjugados útiles para la obtención de anticuerpos y/o para detectar dicha bacteria. Por lo tanto, la presente invención puede englobarse en el campo del desarrollo de nuevas tecnologías para la medicina clínica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran virulencia y uno de los principales microorganismos responsables de las enfermedades infecciosas en los países desarrollados. *S. aureus* provoca enfermedades nosocomiales, infecciones del tracto respiratorio, endocarditis e infecciones de los tejidos blandos. Cuando la infección pasa al torrente sanguíneo el tiempo de identificación del patógeno es un factor clave para actuar y garantizar la supervivencia del paciente. La erradicación de las enfermedades provocadas por este patógeno se ve dificultada por la multirresistencia a antibióticos que presenta y al mismo tiempo por la falta de técnicas rápidas y específicas para identificar el causante de la enfermedad.

Además, *S. aureus* también supone un problema en seguridad alimentaria ya que dicho patógeno puede estar presente en la flora de un individuo sano y cuando no se toman las medidas de higiene necesarias puede ser un contaminante alimenticio y una fuente directa de infección para el ser humano.

En la actualidad el cultivo celular es la técnica de referencia para la identificación del microorganismos patógenos pero dicha técnica presenta la desventaja de que el tiempo de espera oscila entre 24-72 horas (*J Clin Microbiol* 2012, *50*, 195), que es demasiado elevado cuando la vida del paciente está en juego. Por otra parte, también se han descrito métodos de detección de paredes de *S. aureus* mediante ensayos inmunoquímicos utilizando anticuerpos desarrollados a partir de la inmunización de formas semisintéticas del peptidoglicano de *S. aureus*.

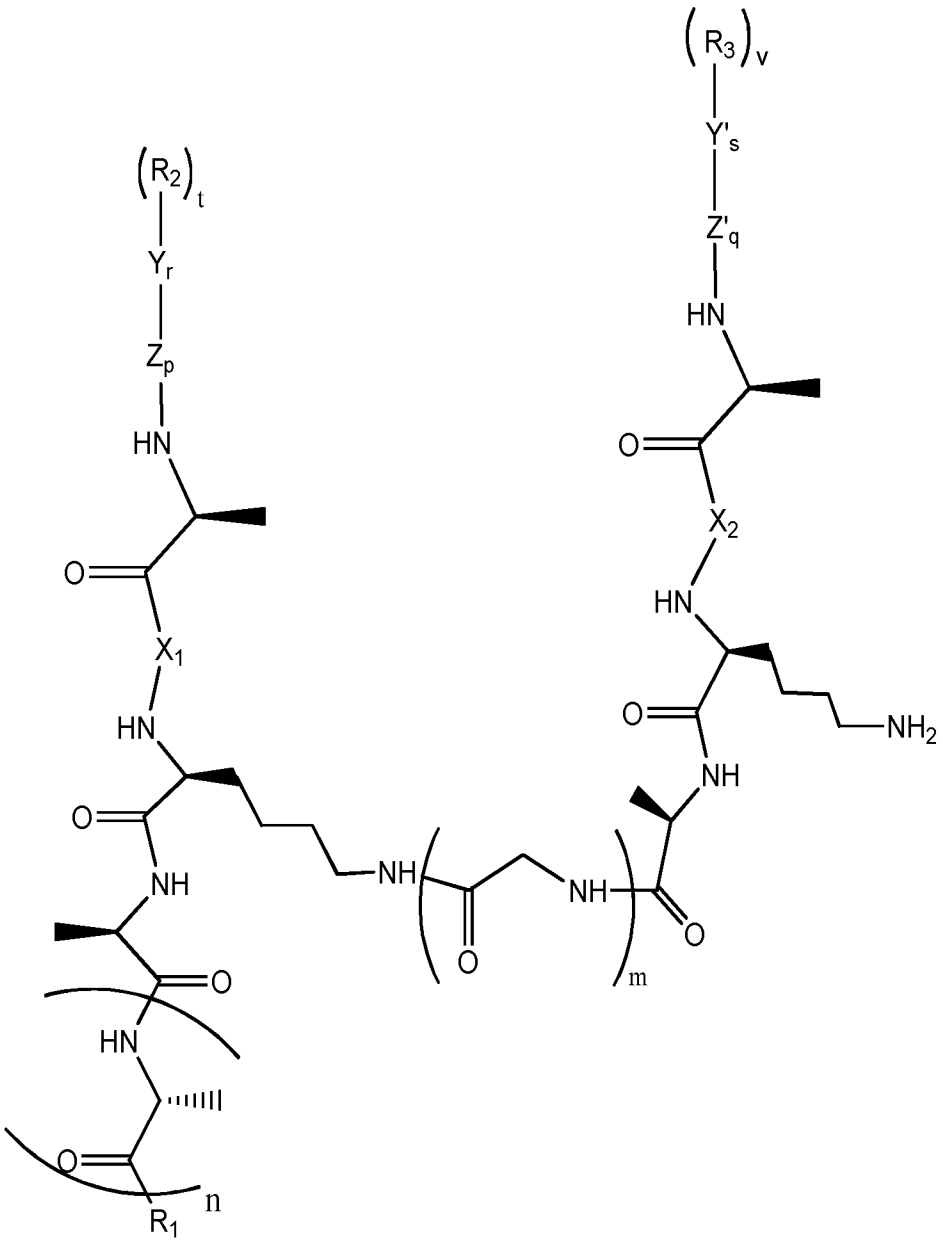
El peptidoglicano (PG) es una macromolécula no cristalina, lo cual dificulta la determinación de la estructura tridimensional a alta resolución, aun así, diversos experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas(HPLC-MS) y de microscopia han elucidado gran parte de dicha estructura. En general, el PG consiste en unidades repetidas de unidades de disacárido, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetil-murámico (MurNAc) entrelazadas por cadenas peptídicas que alternan aminoácidos D- y L-. El PG de *S. aureus* presenta un péptido tallo ([Ala-DGlu(&1)-NH_2][(&1)-Lys-DAla-DAla]) entrelazado con un puente pentaglicil $(Gly)_5$ que se une por un lado a través del grupo ε-NH_2 de la Lys situada en la tercera posición de un péptido tallo y por el otro a través del grupo carbonilo del grupo DAla situado en la cuarta posición de otro péptido tallo (*J. Amer. Chem. Soc*2009, *131*, 7023-7030; *J.Bacteriol.*2004, *186*, 5978).

Algunos autores en el pasado se han ocupado de la producción de anticuerpos frente a secuencias peptídicas particulares del PG de *S. aureus*.En 1977, Seidl y Schleifer (*European J Biochem*1977, 74 (2), 353) desarrollaron un test de aglutinación de látex con anticuerpos producidos contra un péptido sintético de cinco glicinas conjugado a seroalbúmina humana y Wergel *et al.* (*JImmunolMeth*1987, 104, 57) desarrollaron un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en formato *sandwich* con anticuerpos monoclonales de tipo IgM producidos a partir de la inmunización del oligopéptido $(Gly)_5$ en su forma libre. Más recientemente, Sandhu *et al.* (*Analyst*2012, 137 (5), 1130) reportaron la preparación de anticuerpos contra un precursor semisintético del peptidoglicano usado como inmunógeno, el cual contiene una parte peptídica que contiene la cadena de pentaglicinas más el ácido N-acetilmurámico unido a seroalbúmina bovina (BSA). Todos estos trabajos citados han demostrado la posibilidad de generar anticuerpos contra el PG de *S. aureus* pero ninguno proporciona datos respecto a la detectabilidad de la bacteria en términos de unidades formadoras de colonias (UFC) y tampoco muestra el rendimiento en muestras clínicas. Por lo tanto, se hace necesario un método donde se demuestre la capacidad de dicha detección en infecciones producidas por *S. aureus* con tiempos de análisis bajos y con buena sensibilidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se describen haptenos derivados del peptidoglicano de la pared bacteriana de *S. aureus* útiles para la generación de anticuerpos frente a dicha bacteria y útiles para la detección de la misma. Se describe también un método de detección de *S. aureus* mediante anticuerpos generados por inoculación de los inmunógenos obtenidos a partir de la bioconjugación de los haptenos de la presente invención a una proteína; dicho método disminuye significativamente el tiempo de análisis y es de fácil implementación.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde:

R_1 se selecciona de entre OH y NHR'; donde R' se selecciona de entre H o alquilo (C_1-C_4);

n es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

m es un número entero seleccionado de entre 0 y 7;

X_1 y X_2 se seleccionan, cada uno independientemente, de entre D-Glu, D-Gln, D-γ-Glu y D-γ-Gln;

Z y Z' se seleccionan, cada uno independientemente, de entre un aminoácido, que puede ser L o D, seleccionado de la lista que consiste en Gly (glicina), Ala (alanina), Leu (leucina), Ile (isoleucina) o Val (valina); p y q son, cada uno independientemente, un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

Y e Y' se seleccionan, cada uno independientemente, de entre R_4, COR_4 y Cys (cisteína), opcionalmente la cisteina puede contener un grupo protector de tioles;

R_2 y R_3 se seleccionan, independientemente, de entre H, alquilo (C_1-C_4) y CO-alquilo (C_1-C_2);

r, s, t ó v son, independientemente, un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

R_4 es un alquilo (C_1-C_5), sustituido con un grupo -SH, -halógeno, -CΞCH, $-N_3$ o $-COR_5$;

R_5 se selecciona de entre H o OR''; donde R'' se selecciona de entre H o alquilo (C_1-C_4);

con la condición de que:

si r es 1, s es 0 y

si s es 1, r es 0, y

si Y o Y' se selecciona entre R_4 o COR_4, entonces t ó v, respectivamente, es 0.

En adelante nos referiremos a éste como al "compuesto de la invención".

En una realización preferida del compuesto de la invención p y q son 0.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, m es de 3 a 6 y más preferiblemente m es 5.

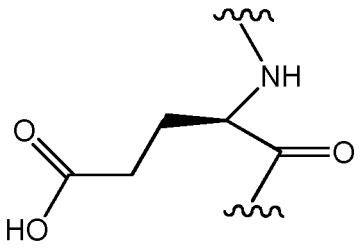
En otra realización preferida del compuesto de la invención, n es 0 y/o R_1 es NHR' y R' se selecciona de entre H o metilo.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, n es 1 y/o R_1 es OH.

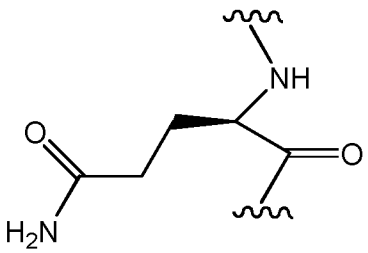
En otra realización preferida del compuesto de la invención, X_1 y/o X_2 son D-Gln o D-γ-Gln.

En otra realización preferida del compuesto de la invención, X_1 y X_2 son iguales.

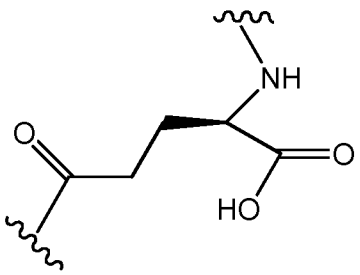
D-Glu o D-ácido glutámico es el grupo:



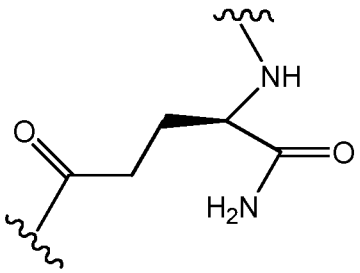
D-Gln o D-glutamina es el grupo:



D-γ-Glu o D-γ-ácido glutámico o D-iGlu es el grupo:



D-γ-Gln o D-γ-glutamina o D-γGlu-NH_2 o D-iGln es el grupo:

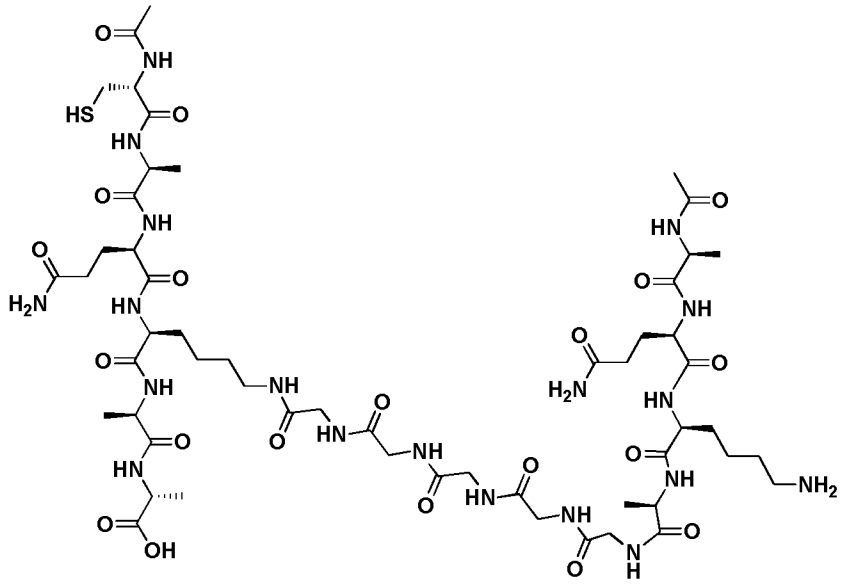


En otra realización preferida del compuesto de la invención Y o Y' es Cys, opcionalmente sustituida por un grupo protector de tioles.

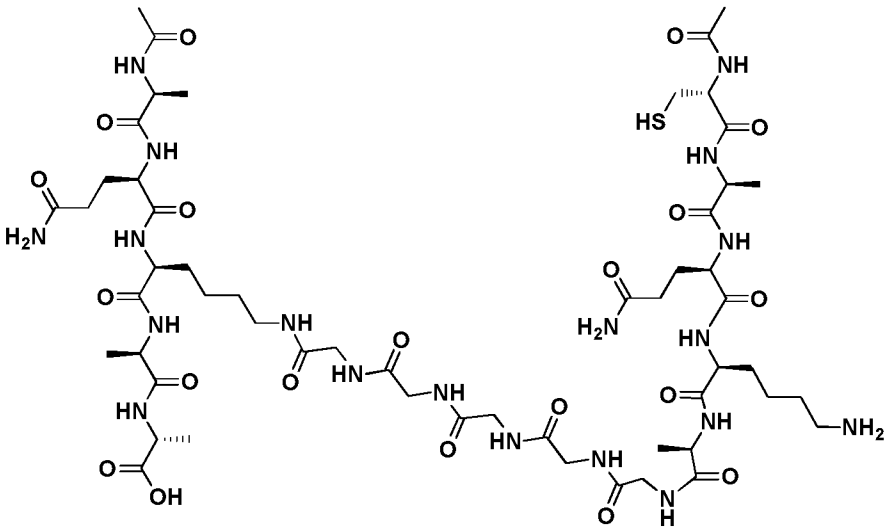
Cuando Y o Y' es Cys, este aminoácido puede estar libre o protegido mediante un grupo protector de tioles, como por ejemplo y sin limitarse a –alquilo(C_1-C_6), –COalquilo(C_1-C_3), –CH_2Oalquilo(C_1-C_3), –COC_6H_5, –CONHalquilo(C_1-C_3), –$COOCH_3$Ph, preferiblemente el grupo protector de tioles es –$COCH_3$.

En otra realización preferida, t y/o v son 1, más preferiblemente R_2 y/o R_3 son COalquilo(C_1-C_2), y más preferiblemente $COCH_3$. Más preferiblemente R_2 y R_3 son COalquilo(C_1-C_2), y más preferiblemente $COCH_3$.

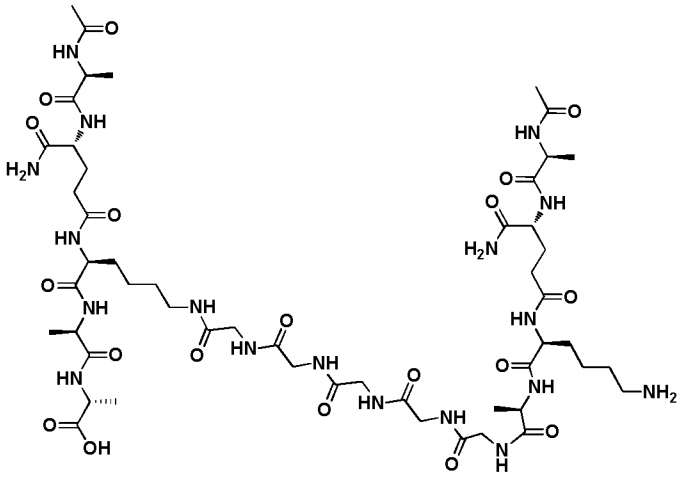
En otra realización preferida, el compuesto de la invención se selecciona de entre:



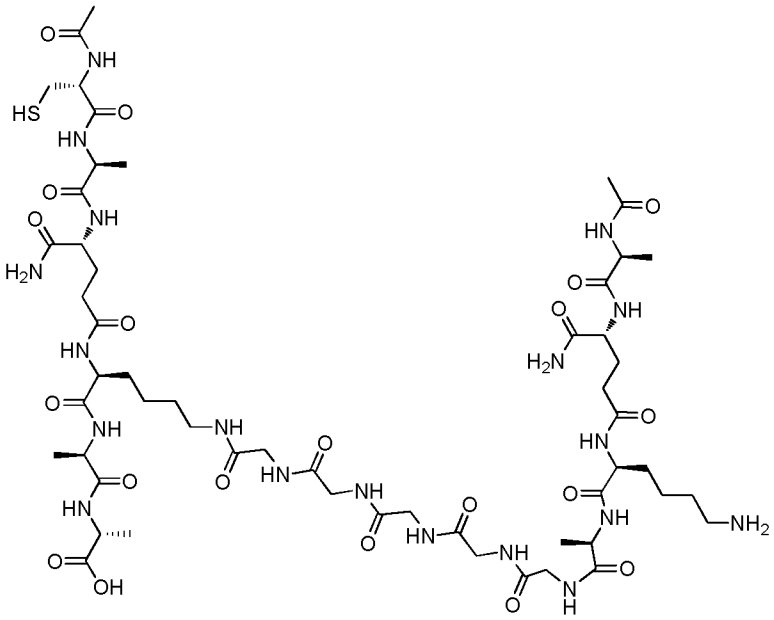
P*Sau*3



P*Sau*4

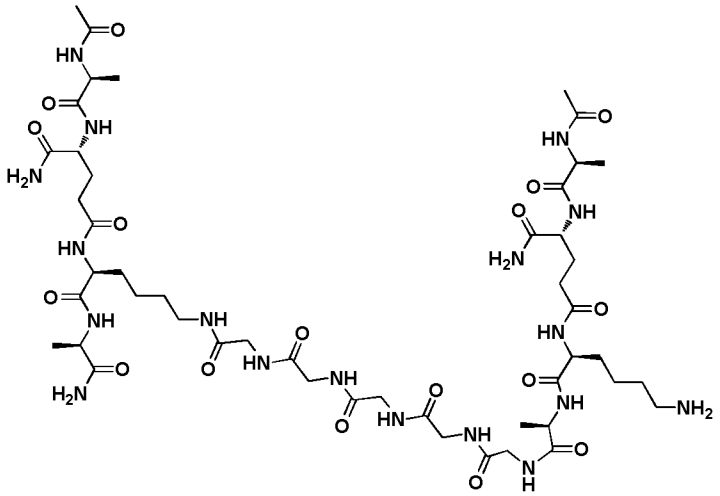


P*Sau*5

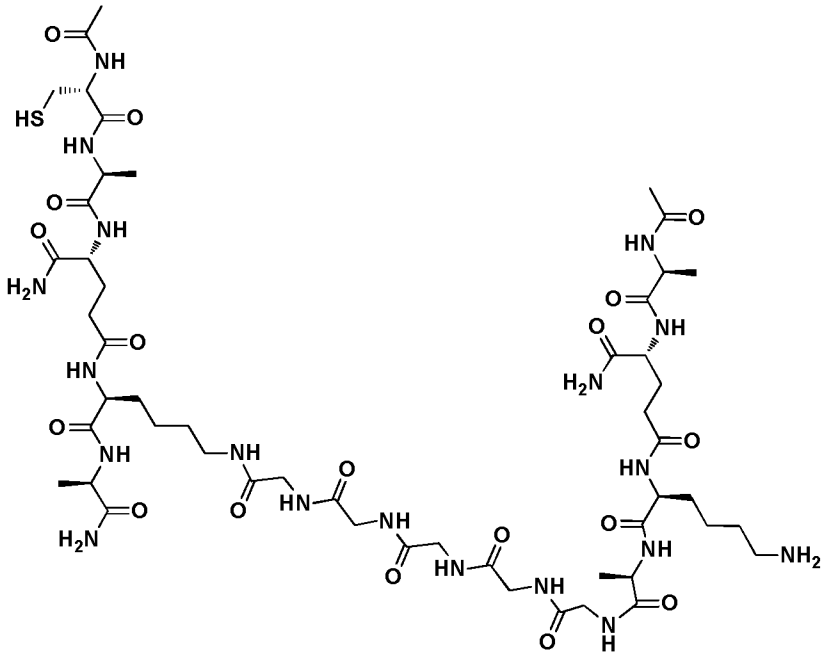


5

PSau6



PSau7



PSau8

Por "alquilo(C_1-C_4)" se refiere, en la presente invención,a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo o *sec*-butilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 2 átomos de carbono o alquilo(C_1-C_2), más preferiblemente es un metilo.

Por "alquilo(C_1-C_5) sustituido" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo,*sec*-butilo, pentilo, etc., que se encuentra sustituido por al menos un sustituyente seleccionado de la lista que consiste en-SH, -halógeno, -C≡CH, -N_3,-CHO, -COOH, -COOalquilo(C_1-C_4).

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de formula (I) del primer aspecto de la invención como hapteno (en adelante "hapteno de la invención").

El término "hapteno", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una molécula que por sí sola no es capaz de generar una respuesta inmune en un animal y necesita estar unida a una macromolécula para generar una respuesta inmune. En la presente invención, el hapteno se selecciona de un compuesto de fórmula (I) del primer aspecto de la presente invención.

En una realización preferida, el hapteno se puede seleccionar de la lista que consiste en P*Sau*3, P*Sau4,* P*Sau6* y P*Sau*8.

El término "antígeno" hace referencia a una molécula, tal como un péptido, un hidrato de carbono, un glicolípido, una glicoproteína o una molécula que es reconocida y se une a un anticuerpo. La parte del antígeno que es la diana de la unión del anticuerpo corresponde al determinante antigénico. En el contexto de la presente invención, el antígeno hace referencia a *S. aureus*, o un analito derivado de *S. aureus,* es decir, a una parte peptídica de la estructura química del peptidoglicano de la pared bacteriana de *S. aureus o* a un hapteno de la invención conjugado con una macromolécula.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un conjugado (a partir de ahora conjugado de la invención) que comprende al menos un hapteno seleccionado de un compuesto de fórmula (I) del primer aspecto de la invención (el hapteno de la invención) junto con al menos un componente seleccionado de la lista que consiste en: una macromolécula, tal como una proteína o un fragmento de la misma, un oligonucleótido o un polisacárido; una etiqueta detectable o un soporte, en particular el soporte puede ser un polímero o un material inorgánico.

El término “conjugado” hace referencia en la presente invención al complejo formado por la unión covalente de un hapteno seleccionado de un compuesto de fórmula (I) y un segundo componente seleccionado del grupo formado por una macromolécula, tal como una proteína o un fragmento de la misma, un oligonucleótido o un polisacárido; una etiqueta detectable o un soporte, como un polímero o un material inorgánico. En particular hace referencia al complejo hapteno-macromolécula. Métodos para la obtención de conjugados hapteno-macromolécula son conocidos por el experto enla materia.

El término “inmunógeno” hace referencia a un conjugado de acuerdo a la invención capaz de generar una respuesta inmune de generación de anticuerpos, es decir, un conjugado formado por un hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), y un segundo componente que comprende una macromolécula que confiere antigenicidad, siendo dicha macromolécula la responsable del carácter inmunogénico del conjugado.

Las macromoléculas en la presente invención pueden ser proteínas o fragmentos de las mismas, oligonucleótidos o polisacáridos. Las proteínas útiles tienen una masa superior a 10 kDA, preferiblemente superior a 15 kDa. Cuando los conjugados de la invención se utilizan para inmunizar un animal, dichas proteínas deben proceder de una especie animal distinta de la especie que se desea inmunizar. Entre las proteínas útiles se incluyen, sin limitación, seroalbúminas de varias especies, por ejemplo bovina (BSA), de conejo (RSA); hemocianinas de molusco, por ejemplo la hemocianina de cangrejo (HCH) o la hemocianina de lapa (KLH); peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA), tiroglobulina y fibrinógeno, así como fragmentos de dichas proteínas que confieren antigenicidad, etc. Preferiblemente la proteína se selecciona de la lista que consiste en hemocianina de cangrejo herradura (HCH), albumina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA) y, conalbúmina (CONA). Más preferiblemente BSA y HCH.

En los conjugados de la invención entre un hapteno y una proteína, las proteínas se unen al hapteno de forma covalente por medio de los aminoácidos accesibles en su superficie, preferiblemente aquellos aminoácidos con cadenas laterales de tipo nucleófilo. El aminoácido reactivo de las proteínas se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse a, cisteína, serina, tirosina y lisina; preferiblemente es

lisina. Los procedimientos para lograr la conjugación de haptenos a otras moléculas portadoras dependen del grupo funcional presente en la molécula de hapteno en cuestión. También hay que tener en cuenta la estabilidad y la solubilidad del hapteno.

El término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico de al menos 4, preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15, preferiblemente no más de 100 nucleótidos. Se contemplan tanto oligonucleótidos formados por nucleótidos convencionales unidos por enlaces fosfodiéster convencionales como variantes de los mismos que incluyen modificaciones en los restos de purina o pirimidina y modificaciones en los restos de ribosa o desoxirribosa.

En una realización particular del conjugado de la invención, el hapteno y la macromolécula están unidos mediante un agente de entrecruzamiento.

En una realización preferida de la presente invención, el hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (**I**), se conjuga a la macromolécula a través del grupo Y o Y'.

En una realización particular el conjugado de la invención está formado por el hapteno y una proteína.

Cuando el grupo Y o Y' del hapteno es una cisteína, el grupo -SH se conjuga a proteínas con maleimidas, o bien por activación de las proteínas con haloacetilos (tales como yodoacetilo).

Cuando el grupo Y o Y' del hapteno contiene ácido carboxílico (-COOH), para la conjugación puede utilizarse, entre otros, el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster-*N*-hidroxisuccinimida (NHS) (este último también conocido como método del éster activo).

Cuando el grupo Y o Y' del hapteno contiene un aldehído (-CHO), este puede ser transformado en grupo carboxilo mediante la formación de O-(carboximetil)oximas. La reacción se efectúa tratando el hapteno con O-(carboximetil)hidroxilamina. La reacción del ácido carboxílico formado con la proteína se continúa por uno de los métodos antes mencionados. Los haptenos que presentan grupos formilo también pueden ser acoplados directamente a través de la formación de las bases de Schiff, que son transformadas a aminas por reducción con borohidruro de sodio.

Cuando el grupo Y o Y' contiene un halógeno la conjugación se realiza sobre una proteína o péptido previamente modificado de forma que tenga grupos tiol reactivos.

Todos estos métodos de conjugación son bien conocidos del estado de la técnica y se describen de modo resumido en Guerra *et al.* 2003 (Guerra M., Morris H. 2003. Revista Cubana de Química, vol. XV, nº 2). Dichos métodos se muestran aquí a título orientativo y no en sentido limitativo, ya que pueden emplearse otros métodos de conjugación conocidos por el experto en la materia.

En otra realización particular, el hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), puede estar unido a un agente de marcaje, a modo de marcador para su detección. En una realización particular alternativa, el hapteno puede estar unido a un soporte, como por ejemplo un polímero o a un material inorgánico.

El término "soporte", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier material sólido al que los componentes de la invención, en particularlos anticuerpos, los haptenos o los conjugados de la invención, se encuentran unidos físicamente, quedando así inmovilizados. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en los inmunoensayos de la presente invención. Los materiales adecuados para el soporte sólido son sintéticos como poliestireno, cloruro de polivinilo, poliamida u otros polímeros sintéticos, polímeros naturales tales como celulosa, así como polímeros naturales derivados tales como acetato de celulosa o nitrocelulosa, y vidrio, especialmente fibras de vidrio. El soporte puede tomar la forma de esferas, bastones, tubos, y placas de microensayo o microtitulación. Las estructuras similares a láminas tales como tiras de papel, placas pequeñas y membranas también son adecuadas. La superficie de los soportes puede ser permeable e impermeable para soluciones acuosas. Materiales sólidos inorgánicos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, silicona, cristal, cuarzo, cerámica, metales y sus óxidos, silicio, silicatos, siliciuros, nitruros, carburo de silicio amorfo así como cualquier otro material adecuado para microfabricación o microlitografía. Soportes sólidos orgánicos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación polímeros como poliimida, acrilato, polimetilmetacrilato, poliestireno o nitrocelulosa.

El término “etiqueta detectable” o “agente de marcaje” hace referencia a una etiqueta molecular quepermite la detección, localización y/o identificación de la molécula a la que está unido,mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección, bien mediantemedios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Ejemplosde etiquetas detectables para el marcaje de compuestos incluyen, aunque no se limitan aisótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, enzimas y combinaciones de éstos. Métodos para el marcaje y guía para la elección de marcajes adecuados para diferentes propósitos son conocidos por el experto en la materia.

En otra realización particular de cualquiera de las anteriores, el conjugadode la invención tiene carácter inmunógeno, es decir, induce la formación de anticuerpos.

Así, un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un conjugado del tercer aspecto de la invención que comprende un hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula general (I), y una macromolécula, que confiere antigenicidad para la obtención de anticuerpos.

El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza en la presente invención, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno, tal como, por ejemplo, una proteína. Tal y como es conocido por el experto en la materia, hay 5 isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE). El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica contra elinmunógenode la invención.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo (a partir de ahora “anticuerpo de la invención”) obtenido mediante la inmunización con el conjugado de la invención, este anticuerpo reconoce específicamente al hapteno del conjugado del tercer aspecto de la presente invención, a *S. aureus* y/o un analito derivado de *S. aureus*. Preferiblemente el anticuerpo es monoclonal o policlonal.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención está unido a un agente de marcaje que permita su localización y/o identificación, mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el método consiste en inmunizar un animal con un conjugado según la invención que comprende un hapteno, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), y una macromolécula que confiere inmunogenicidad, y posteriormente extraer células del bazo del animal inmunizado, que se fusionan con células de mieloma en presencia de un inductor de la fusión, tal como PEG-1500 por procedimientos estándar (Harlow D y Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York). Los hibridomas se seleccionan y se subclonan por dilución. Los clones aptos para su expansión se constituyen en una línea celular de hibridoma. A continuación, dicha línea celular de hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado para que las células de hibridoma produzcan anticuerpos y los secreten al medio, y se recoge posteriormente el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxiapatito, electroforesis en gel o diálisis. Por lo tanto, en una realización de la invención la obtención de anticuerpos comprende la administración de un conjugado de la invención y la recolección de células tisulares de dicho animal capaces de producir dichos anticuerpos.

Los "anticuerpos policlonales" son poblaciones heterogéneas de anticuerpos que reconocen varios epítopos de un mismo antígeno, es decir frente a diferentes determinantes antigénicos. Para la obtención de anticuerpos policlonales contra un hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), se inmuniza un animal no humano con un conjugado de la invención según métodos conocidos por el experto en la técnica. Una vez obtenido un título de anticuerpos aceptable, el animal

es exanguinado y se recoge el antisuero que contiene los anticuerpos séricos formados por dicho animal.

En una realización preferida el conjugado de la invención utilizado para la producción de anticuerpos es un hapteno de la invención, preferiblemente P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*6 o P*Sau*8, conjugado con HCH.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un antisuero que comprende el anticuerpo del quinto aspecto de la presente invención.

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención, el inmunógeno es el conjugado de la invención y el antisuero comprende anticuerpos específicos generados frente al conjugado de la invención, los anticuerpos de la invención.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso del hapteno del segundo aspecto de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), o del conjugado del tercer aspecto de la invención, o del anticuerpo del quinto aspecto de la invención o del antisuero del sexto aspecto de la invención para la detección de *S. aureus* en una muestra biológica aislada de un sujeto.

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso del hapteno del segundo aspecto de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (I), o del conjugado del tercer aspecto de la invención, o del anticuerpo del quinto aspecto de la invención o del antisuero del sexto aspecto de la invención para la detección de *S. aureus* en una muestra alimentaria.

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar *S. aureus* o un analito derivado de *S. aureus* en una muestra (a partir de ahora "método de la invención") que comprende la utilización de un anticuerpo del quinto aspecto de la invención o de un fragmento del mismo con capacidad de unión al antígeno o de un antisuero del sexto aspecto de la invención que comprende el anticuerpo anterior y la

detección de la unión de dicho anticuerpo a *S. aureus*. Preferiblemente además comprende el uso del conjugado de la invención.

El término "muestra", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a la muestra a analizar por el método de la invención, susceptible de contener el analito a detectar, en esta invención se entiende por analito a *S. aureus* o un analito derivado de esta bacteria. Cualquier tipo de muestra puede analizarse según el método de la invención. Así, se contempla el análisis de muestras biológicas aisladas tanto de procedencia animal como humana, ya sea con finalidad clínica (por ejemplo, para detectar infecciones provocadas por la presencia de *S. aureus* y establecer un método terapéutico para combatirla) o en el ámbito de la seguridad alimentaria para el análisis de contaminantes en muestras alimentarias o seguridad ambiental tales como agua, suelo o superficie, o de muestras procedentes de cultivos celulares.

Por "analito derivado de *S. aureus*" se entiende en esta invención un compuesto químico que mantiene una parte peptídica de la estructura química del peptidoglicano de la pared bacteriana de *S.aureus*, que puede ser reconocido específicamente por parte de los anticuerpos de la invención. En una realización preferida el analito derivado del peptidoglicano de *S. aureus* es un compuesto de fórmula (I), y en una realización más preferida es un compuesto de formula (I) seleccionado entre P*Sau*5 y P*Sau*7. Estos analitos se utilizan como muestra patrón para hacer la recta de calibrado en el ensayo ELISA.

En una realización preferida la muestra biológica puede ser, por ejemplo, sin limitarse, sangre, suero, plasma, saliva, orina, esputo, lavados broncoalveolares (BAL) y broncoaspirados (BAS). En una realización más preferida, la muestra en la que se detecta infecciones provocadas por *S. aureus* es una muestra de BAL o BAS.

Por tanto, el método de la invención comprende al menos las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la muestra a analizar con el anticuerpo de la invención o de un fragmento del mismo durante el tiempo necesario para su unión (o incubación),

(b) identificar la formación de los inmunocomplejos formados con dicho anticuerpo y/o medir la cantidad de dichos inmunocomplejos.

Adicionalmente, dicho método puede requerir también un conjugado según la invención. Por tanto, en una realización particular, además del anticuerpo de la invención en el paso (a) se utiliza un conjugado; donde dicho conjugado comprende un hapteno de la invención, seleccionado de un compuesto de fórmula (**I**), y un segundo componente que puede ser una macromolécula, un agente de marcaje detectable o un soporte, como un polímero o un material inorgánico.

El término "método de detección" hace referencia a un método que permite establecer si una muestra determinada comprende o no comprende *S. aureus* o un analito derivado de *S. aureus* con una sensibilidad y especificidad adecuadas. Los intervalos típicos desensibilidad de detección pueden estar entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 90% de la señal máxima. La sensibilidad de un método de detección viene dada por la probabilidad de que la detección sea positiva en una muestra que contiene el compuesto que se pretende detectar. La sensibilidad, expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de casos de detección positiva respecto al total de casos en los que el compuesto a detectar está presente. A mayor sensibilidad, mayor número de casos positivos y menor número de falsos negativos. La especificidad de un método de diagnóstico viene dada por la probabilidad de que la detección sea negativa en una muestra que no contiene el compuesto que se pretende detectar. La especificidad, expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de casos de detección negativa respecto al total de casos en los que el compuesto a detectar está ausente. A mayor especificidad, menor es la probabilidad de obtener un falso positivo.

El término "inmunoensayo" o "técnica inmunoquímica de análisis" es un método inmunoquímico de análisis en el que se emplea un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno. Los inmunoensayos comprenden, sin limitarse a, técnicas inmunológicas tales como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Western-blot, RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-ELISA*), cromatografía de inmunoafinidad, ensayos de tira o de flujo lateral (*lateral-flow immunoassay*), inmunoprecipitación, *dot-blot*, radio inmunoensayo, citometría de flujo, técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips de biomarcadores, de biosensores o *microarrays* que incluyan anticuerpos específicos

o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los “dipsticks”. Dentro de otros inmunoensayos también se encuentran los inmunosensores cuyo principio de transducción puede ser óptico, electroquímico, másico o termométrico. Igualmente, también se incluyen los inmunosorbentes o sistemas de extracción por inmunoafinidad, que permiten la extracción selectiva del analito en el seno de una mezcla compleja. Estos sistemas, suelen ser materiales biohíbridos, resultado de la unión estable del anticuerpo a un soporte sólido (polímero, material inorgánico, partículas metálicas, etc.), y que se utilizan para la separación o extracción del analito del resto de componentes de la matriz. Tales formatos pueden ser heterogéneos u homogéneos, secuenciales o simultáneos, competitivos o no competitivos.

En una realización preferida del método de la invención, la detección se realiza mediante una técnica inmunoquímica. Preferiblemente la técnica inmunoquímica es un ensayo tipo ELISA. Son conocidos diferentes tipos de ELISA, tales como el ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA tipo sándwich, de carácter competitivo o no competitivo. Son métodos incluidos en la presente invención, aquellos ensayos ELISA en los que el conjugado de la invención está anclado al soporte, así como aquellos ensayos ELISA en los que lo anclado al soporte es el anticuerpo de la invención. Más preferiblemente, el método de detección es un ensayo ELISA competitivo indirecto.

El término “ELISA competitivo indirecto”, se refiere a un ensayo en el que se añaden conjuntamente la muestraa analizar, susceptible de contener una concentración determinada de *S. aureus* o un analito derivado, y un anticuerpo específico según la invención que reconoce *S. aureus*, donde el analito presente en la muestra competirá por su unión al anticuerpo con un conjugado inmovilizado en un soporte sólido. Cuando la muestra contiene el analito no quedan anticuerpos disponibles para reaccionar con los conjugados inmovilizados y por tanto la reacción producida por el agente de marcaje es poco intensa. Mientras que cuando no hay analito presente en la muestra se unen una gran cantidad de anticuerpos al conjugado inmovilizado en la fase sólida. El término “ELISA competitivo directo” es similar y caracteriza el ensayo en el que se inmoviliza a la placa de ELISA el anticuerpo o antisuero específico y la muestra a analizar se mezcla con un conjugado del hapteno con un agente de marcaje detectable. Como en el caso del ensayo indirecto ambos compuestos compiten por los anticuerpos y la señal resultante del ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

En una realización particular, el ensayo ELISA competitivo indirecto comprende las siguientes etapas:

a. inmovilizar en un soporte sólido un hapteno o el conjugado de la invención, preferiblemente un conjugado que comprende un hapteno de la invención y una macromolécula o un conjugado que comprende el hapteno de la invención y un polímero;
b. eliminar el hapteno o el conjugado no inmovilizado,
c. añadir la muestra a analizar y un primer anticuerpo anti-P*Sau* obtenido al inmunizar un animal con un conjugado de la invención, o bien un antisuero que contiene el anticuerpo, al soporte sólido del apartado (a) e incubar,
d. eliminar el primer anticuerpo y la muestra no unidos al conjugado o al hapteno,
e. añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo que queda unido en el paso (c), e incubar,
f. eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo,
g. identificar y/o medir la cantidad de complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

En la primera etapa del método de la invención [etapa (a)] se inmoviliza sobre un soporte sólido un hapteno o un conjugado que comprende un hapteno de la invención y una macromolécula, preferiblemente una proteína, o bien un conjugado que comprende un hapteno de la invención y un polímero. Se puede emplear cualquiera de una amplia variedad de soportes sólidos en las técnicas inmunoquímicas de la presente invención tal y como se han descrito anteriormente. En el contexto de la presente realización el soporte sólido son placas para el análisis de inmunoensayos tipo ELISA. La inmovilización del conjugado en la superficie de un soporte como el plástico de poliestireno está dirigida por la química de la superficie. La capacidad de inmovilización de los conjugados que en este caso actúan como antígenos competidores, depende de muchos factores, tales como el tiempo y la temperatura. La etapa de inmovilización del hapteno o del conjugado puede incluir el bloqueo de los espacios de soporte que no hayan sido ocupados por dichos conjugados. El bloqueo se lleva a cabo mediante proteínas o detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas, el conjugado que se

inmoviliza debe comprender una macromolécula diferente a la empleada en el conjugado utilizado como inmunógeno. En una realización preferida el conjugado inmovilizado en esta etapa comprende un hapteno de la invención y una macromolécula, preferiblemente BSA.

Los componentes pueden encontrarse inmovilizados al soporte mediante enlaces covalentes omediante enlaces no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o enlaces iónicos. Una revisión general de micromatrices y de soportes adecuados se ha descrito en Shalon *et al*. (Genome Res 1996, 6, 639). Alternativamente, es posible usar soportes activados mediante grupos epoxi, grupos vinil sulfónico, grupos éster activos, grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos tiol, grupos isotiocianato y similares. En el caso de que el soporte se encuentre activado mediante grupos epoxi, estos grupos incluyen 3-glisidoxipropiltrimetoxisilano (GTMS), 2-(3,4 epoxiciclohexil)etiltrimetoxisilano, 3-glisidoxipropilmetildietoxisilano, 3-glisidoxipropil trietoxisilano y similares.

La etapa (b) del método consiste en eliminar el hapteno o el conjugado no inmovilizado. Típicamente, esto se lleva a cabo mediante lavados, habitualmente entre 1 y 10 lavados, preferiblementede 2 a 5 lavados. Los lavados tienen la finalidad de eliminar los conjugados que no se hayan inmovilizado, de forma que todo aquello que sea detectado sea específico y deseado.

La tercera etapa del método de la invención [etapa (c)] consiste en añadir la muestra aanalizar susceptible de contener el analito que se quiere detectar y/o cuantificar, es decir, *S. aureus* o un analito derivado, y un primer anticuerpo anti-PS*au* según la invención en el soporte sólido del apartado (a) e incubar. Esta etapa es la etapa competitiva del ensayo.

Por "primer anticuerpo anti-P*Sau*" se entiende un anticuerpo según la invención, generado contra un conjugado que comprende un hapteno de la invención y una macromolécula que confiere antigenicidad, preferiblemente frente a un conjugado que comprende el hapteno de la invención y la proteína HCH. El *S. aureus* o el analito derivado presente en la muestra a analizar y el hapteno o el conjugado inmovilizado en el soporte sólido de la etapa (a) compiten por la unión del primer anticuerpo anti-P*Sau*. El hapteno del conjugado inmovilizado de la etapa (a) y el hapteno del conjugado

utilizado para laobtención de los anticuerpos de la etapa (c) puede o no ser el mismo.

La etapa (c) es la etapa crucial del ensayo. En una realización preferida la etapa (c) tiene una duración comprendida entre 10 minutos y 1 hora, preferiblemente 30 minutos. Este ensayo ha demostrado tolerar un amplio rango de fuerzas iónicas y valores de pH. Los inventores han optimizado el tampón utilizado en la etapa competitiva del ensayo [etapa (c)]. En una realización de la invención, la etapa (c) se realiza en presencia de un tampón que tiene las siguientes características:

i. una concentración de detergente no iónico entre 0% y 0,1% preferiblemente de 0,05%;
ii. un pH comprendido entre 5,5 y 9,5, preferiblemente de 7,5;
iii. una conductividad comprendida entre 1,5 y 52,2 mS/cm, preferiblemente de 1,5 mS/cm.

La cuarta etapa del método de la invención [etapa (d)] consiste en eliminar el primer anticuerpo no unido al hapteno o al conjugado inmovilizado. Este anticuerpo no unido se habrá unido al analito. Típicamente, esto se realiza mediante lavados en las mismas condiciones que la etapa (b).

La siguiente etapa del método de la invención [etapa (e)] consiste en añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar. Dicho segundo anticuerpo está conjugado con un compuesto capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Este compuesto puede unirse al anticuerpo directamente o a través de otro componente. El segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina natural aislada de una especie no humana y diferente de la especie utilizada para producir el primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo murino anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgG, anticuerpo de cabra anti-IgM) o se puede producir de forma recombinante o sintética. Puede ser una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina (por ejemplo,FAb, F[Ab]2). Según se desee, se pueden emplear otras moléculas de unión junto con o en lugar de tales segundos anticuerpos. En una realización preferida, el segundo anticuerpo está conjugado con un enzima, preferiblemente peroxidasa, más preferiblemente HRP. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la unión del segundo anticuerpo al primer anticuerpo son conocidas por los expertos en la materia.

A continuación tiene lugar la etapa (f) que consiste en eliminar el segundo anticuerpo nounido al primer anticuerpo. Típicamente, esto se efectúa mediante un lavado en las mismas condiciones que en las etapas (b) y (d).

Finalmente, la última etapa (g) consiste en la identificación y/o medir la cantidad del complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente. Un sustrato indicador es una sustancia capaz de reaccionar con el agente de marcaje del segundo anticuerpo dando como resultado un compuesto cromóforo, fluorescente o quimioluminiscente que puede detectarse por métodos conocidos en el estado de la técnica. Sustratos indicadores adecuados para llevar a cabo la presente invención son conocidos por el experto en la materia y accesibles a partir de diversas fuentes comerciales. Preferiblemente, el sustrato indicador es cromogénico, como por ejemplo la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el ácidoazino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o la fenilendiamina, sin limitación de utilizar otros sustratos como marcadores químicos (por ejemplo, marcadores de oro coloidal, bolas de látex). Cuando se emplean sustratos cromogénicos, la presencia de *S. aureus* o un analito derivado en la muestra se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad es inversamente proporcional al número de moléculas de analito unidas al primer anticuerpo anti-P*Sau* añadido en la etapa (c) y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico la detección y cuantificación se realiza por medio de fluorimetría, y si el sustrato es quimioluminiscente, la señal se puede cuantificar por medio de un luminómetro. En una realización particular de la invención, el marcador enzimático es peroxidasa de rábano (HRP), el sustrato es cromogénico y la reacción es enzimática. En este caso, la reacción es inhibida pasado un tiempo desde que se añade el sustrato y para ello se cambian las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima que se está utilizando.

El método puede comprender además un recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de analitos derivados de *S. aureus* (entre ellos se puede utilizar P*Sau*5 y/o P*Sau*7) que permite cuantificarla concentración de *S. aureus* detectada en una muestra.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo para la detección de *S. aureus* o un analito derivado en una muestra que comprende al menos un hapteno de la invención, un conjugado del tercer aspecto de la invención, un anticuerpo del quinto aspecto de la invención o un antisuero del sexto aspecto de la invención, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente el hapteno, el conjugado o el anticuerpo están inmovilizados sobre un soporte sólido. Aún más preferiblemente el kit comprende además un anticuerpo contra los anticuerpos anti-P*Sau* según la invención.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit o dispositivo del décimo aspecto de la invención para la detección de *S. aureus* o un analito derivado en una muestra biológica o en una muestra alimentaria.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Curvas de calibración normalizadas para el ELISA P*Sau*3-MP-BSA/As291. **1A:** Curva de calibración obtenida con el PG de *S. aureus* comercial en PBT.**1B:**Curvas de calibración de los epítopos peptídicos P*Sau*5 y P*Sau*7 en PBT, de P*Sau*7 en PBST-D, el tampón del ensayo para muestras desglicosiladas y de muestras de BAL y BAS desglicosiladas. Medidas de N=2 o 3 días, donde cada día la medida está realizada por triplicado en tres pocillos.

FIG. 2 Efectos de los diferentes parámetros físico-químicos del inmunoensayo P*Sau*3-MP-BSA/As291. Los experimentos se realizaron usando estándares de PG en PBST. **2A:** Efecto del pH del tampón del ensayo; **2B**: Efecto de la fuerza iónica del tampón del ensayo; **3C**: Efecto porcentaje de Tween 20 en el tampón del ensayo; **2D:** Efecto del tiempo de preincubación entre el anticuerpo y el analito; **2E**: Efecto del tiempo de la etapa de competencia. Los resultados se obtuvieron de la calibración de las curvas de

calibrado realizadas en las diferentes condiciones mostradas. Las curvas de calibración se realizaron por triplicado en los pocillos de la placa por cada una de las concentraciones. Los valores de IC_{50} están expresados en μg mL^{-1}. Leyenda: ■ A_{max}; ▟ IC_{50}.

FIG. 3 Evaluación del efecto matriz del extracto de desglicosilación en el ELISA P*Sau*3-MP-BSA/As291.

FIG.4 Inmunoequivalentes de P*Sau7* medidos antes y despuésdel tratamiento de desglicosilación de PG comercial preparado a distintas concentraciones.

FIG.5 Respuesta inmunoquímica de *S. aureus* CECT 5190 respecto a *P. aeruginosa* CECT 110 y *E. coli* K12 CECT 433 antes y después del tratamiento de desglicosilación. Todas las suspensiones se prepararon a una concentración de 10^7 UFC mL^{-1}.

FIG 6 Muestras de *S. aureus*CECT5190 dopadas a diferentes densidades en PBS, BAL y BAS. *Indica el límite de detección de las muestras desglicosiladas en PBS.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Los compuestos de fórmula (**I**) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

Material y métodos:

A. QUÍMICA

Métodos generales e instrumentación. Para la síntesis de los péptidos P*Sau*3-P*Sau*8. El crudo de los péptidos se purificaron utilizando un método semipreparativo *RP-HPLC Water 2487* y detector de doble longitud de onda *XBridge BEH 130* y columna C18, 5 µm, 10x100 mm con una velocidad de flujo de 16 mL min^{-1} en un gradiente de 0-50 durante 10 min, eluyentes agua con 1% de TFA y MeCN con TFA al 1%.

Síntesis de los péptidos:

Los péptidos P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*5, P*Sau*6, P*Sau*7 y P*Sau*8 se sintetizaron manualmente en jeringas de polipropileno equipadas con discos porosos de polietileno usando el soporte polimérico adecuado en cada caso. P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*5 y P*Sau*6 se sintetizaron en 2-cloro resina de tritilo (2-CTC, 600 mg; 1 mmol g^{-1}) y resina *H-Rink Amide ChemMatrix*® (600 mg, 0,53 mmol g^{-1}) se empleó para la síntesis de P*Sau*7 y P*Sau*8. Los disolventes y los reactivos solubles se eliminaron por succión. Los péptidos P*Sau* se sintetizaron usando una estrategia Fmoc/tBu/Alloc, usando en todos los casos Fmoc-L-Lys(Alloc)-OH para la L-Lys en la tercera posición del primer péptido tallo y Fmoc-L-Lys(Boc) para otraL-Lyslocalizada en el segundo péptido tallo. Fmoc-DGlu-NH2 se usó para P*Sau*5, P*Sau*6, P*Sau*7 y P*Sau*8 y Fmoc-DGln(Trt)-OH para P*Sau*3, P*Sau*4.Fmoc-LCys(Trt) se empleó para incorporar el LCys en estos cuatro péptidos.

Para P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*5 y P*Sau*6, previamente a la introducción del primer aminoácido a la resina 2-CTC se lavó con DMF (3 x 5 mL x 1 min) y CH_2Cl_2 (3 x 5 mL x 1 min). Fmoc-DAla-OH (1 equiv.) y DIEA(10 equiv.) en CH_2Cl_2 se añadió a la resina, y la mezcla se agitó durante 55 min a 25°C. La resina se bloqueó añadiendo MeOH durante 10 min a 25°C, después se lavó con DMF (3 x 5 mL x 1 mL) y CH_2Cl_2 (3 x 5 mL x 1 min). Para P*Sau*7 y P*Sau*8 la introducción del primer aminoácido (DAla) se logró usando condiciones de bloqueo estándares.

En todos los péptidos P*Sau*, la secuencia del primer péptido tallo se sintetizó y se acetiló en la posición N-terminal. Después, el grupo Alloc se eliminó y los aminoácidos necesarios se introdujeron para sintetizar el puente pentaglicil y el segundo péptido tallo. Finalmente, el grupo Fmoc se eliminó de la posición *N*-terminal del segundo péptido tallo y de la amina acetilada. Las reacciones de acoplamiento se realizaron

con el correspondiente Fmoc-aminoácido (3 equiv.) y DIC (3 equiv.) en DMF durante 1 h. El grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con una mezcla de piperidina-DMF (1:4 v/v; 2 x 5 min). El ensayo colorimétrico de Kaiser fue utilizado para la detección de la incorporación de los aminoácidos. Cuando fue necesario el reacoplamiento se realizó con HBTU (3 equiv), HOAT (3 equiv) y DIEA (4 equiv) en DMF durante 40 min.

Las acetilaciones se llevaron a cabo con anhídrido acético (10 equiv), DIEA (10 equiv) en DCM durante 15 min. El grupo Alloc se eliminó con fenilsilano (10 equiv), tetraquistrifenilfosfina Pd cero (0,1 equiv) en DCM (3 x 15 min). La escisión de los péptidos de la resina se llevó a cabo con una mezcla de TFA-H_2O-TIS (95: 2,5: 2,5) durante 1 hora. Después de este tiempo el TFA se eliminó por evaporación y los péptidos se precipitaron por adición de éter dietílico anhidro frío, se centrifugaron y el sobrenadante se descartó. El sólidose disolvió en H_2O-MeCN (1:1) y se liofilizó. Los péptidos se caracterizaron mediante HPLC y HPLC-MS.

El crudo de los péptidos P*Sau* se purificó por cromatografía semipreparativa HPLC de fase reversa usando un gradiente linear de 0% B a 50% B en 10 min, a un flujo de 16 mL min^{-1} y detección por UV a 220 nm. El sistema de elución fue A:H_2O:TFA (99:1, v/v) y B: CH3CN (99:1), v/v).

P*Sau*3: 62 mg, 98,3% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358,48; encontrado por LC-MS(ES): 1359,0 $[M+H]^+$

P*Sau*4: 62 mg, 99,9% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358,48; encontrado por LC-MS(ES): 1359,0 $[M+H]^+$

P*Sau*5: 35 mg, 96,2% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358,48; encontrado porLC-MS(ES): 1359,0 $[M+H]^+$

P*Sau*6: 5 mg, 99,9% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{54}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1358,48; encontrado porLC-MS(ES): 1360,18 $[M+H]^+$y 644,77 $[M+2H]^{2+}$

P*Sau*7: 38 mg; 99,9% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{48}H_{82}N_{18}O_{17}$: 1183,28; encontrado por LC-MS(ES): 1184,65 $[M+H]^+$y 593,04 $[M+2H]^{2+}$

P*Sau*8: 47 mg, 99,9% pureza (determinado por HPLC a 220 nm). Masa teórica para $C_{51}H_{87}N_{19}O_{18}S$: 1286,42; encontrado por LC-MS(ES): 1287,69 $[M+H]^+$y 644,5 $[M+2H]^{2+}$

B. INMUNOQUIMICA

Métodos generales e Instrumentación. El MALDI-TOF/TOF-MS (espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de desorción láser asistida por matriz de ionización) utilizado para caracterizar los conjugados de proteína fue AUTOFLEX (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con láser SmartBeam que funciona a 200 Hz. El pH y la conductividad de todos los tampones y soluciones se midieron con un medidor de pH pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). La purificación de proteínas se realizó mediante diálisis utilizando membrana tubular de celulosa regenerada con una línea de corte de un peso molecular de 12.000-14.000 (Cellu·Sep de la serie T membranas; Membrane filtration productes Inc., Seguin, EE.UU.) o mediante cromatografía de exclusión molecular (HiTrap® Sephadex® G-25 columna superfina; Amersham Biosciences). Placas de microtitulación de poliestireno se adquirieron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). Las etapas de lavado se llevaron a cabo usando un lavador de microplacas ELx405 HT (BioTek, Vinooski, Vermont, EE.UU.). Las absorbancias se leyeron usando un SpectamaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) en un solo modo de longitud de onda de 450 nm. Las curvas en formato competitivo fueron analizadas con una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices), y GraphPad Prism® (GraphPad Sofware Inc., San Diego, CA). La curva estándar se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros de acuerdo con la fórmula Y = [(AB) / 1 - (x / C) ^ D] + B, donde A es la señal máxima, B es el mínimo de la señal, C es la que produce el 50% de la señal máxima concentración, y D es la pendiente en el punto de inflexión de la curva.

Tampones. El PBS es tampón fosfato 10 mM en una solución de NaCl 140 mM, y el pH es 7,5. El PBST es PBS con 0,05% de Tween 20. PBT es PBST sin NaCl. El PBST-D es una solución de extracción en fase acuosa en blanco resultante del tratamiento desglicosilación química, realizado como se describe a continuación, se diluyó 1/3.5 con PBT. El tampón de tapizado es tampón carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6. Tampón citrato es una solución 40 mM de citrato de sodio pH 5,5. La solución

de sustrato contiene 0,01% TMB (3,3 ', 5,5'-tetrametilbenzidina) y 0,004% de H_2O_2 en tampón citrato. El tampón borato es 0,2 M de ácido bórico / borato de sodio pH 8,7.

Reactivos y inmunorreactivos. Los péptidos P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*5, P*Sau*6, P*Sau*7 y P*Sau*8 se sintetizaron como se describe en la sección química. El peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (77140) y el anti-IgG de conejo-peroxidasa (A8275) se adquirieron de Sigma-Aldrich. *Staphylococcus aureus* CECT 5190, *Escherichia coli* K12 CECT 433 y *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110 fueron suministrados por la Plataforma de Producción de Proteínas (PPP, grupo de Microbiología Aplicada, Universidad Autónoma de Barcelona) previamente inactivado por calor a 100°C. Las muestras se suspendieron en PBS y se almacenaron a -40°C.

Síntesis de los bioconjugados. Los bioconjugados de proteína-péptido de haptenos con un residuo LCys se sintetizaron utilizando propanoato de N-succinimidil-3-maleimidilo (N-SMP) o yodoacetato de N-succinimidilo (N-SIA) como brazos espaciadores heterobifuncionales, utilizando el procedimiento general descrito a continuación, para obtener el péptido malimidopropilo correspondiente (péptido-MP) o péptido-yodoacetilo (péptido-IA-conjugados de proteína). P*Sau*6 y P*Sau*8 se acoplaron a HCH (hemocianina de cangrejo herradura) y BSA (albúmina de suero bovino), mientras que P*Sau*3 y P*Sau*4 sólo se acoplaron a BSA. La bioconjugación de los haptenos P*Sau*3, P*Sau*4, P*Sau*6 y P*Sau*8 se realizó a través de un procedimiento de dos pasos:

Paso 1: Activación de las proteínas. Se añadió una solución de N-SMP (1,6 mol, 0,43 mg) o N-SIA (9,22 mol, 2,61 mg) en DMF seca (200 µL) gota a gota a una solución de la proteína (HCH o BSA, 10 mg cada uno) en tampón borato (1,8 mL). La mezcla se agitó 4 h a temperatura ambiente, y después se purificó por exclusión de tamaño molecular usando tampón borato como eluyente. Las fracciones eluidas (0,5 mL) de los correspondientes MP-proteína o IA-proteína conjugados se recogieron en tubos Eppendorf, y los que dieron positivo en la prueba de proteína de Bradford se combinaron (3 mL). Una parte de esta solución se reservó para análisis MALDI-TOF-MS, y el resto se usó para la conjugación como se describe en el paso 2.

Paso 2: Bioconjugación. Los haptenos P*Sau*3 (2,17 mg, 1,6 mmol), P*Sau*4 (2,17 mg, 1,6 mmol), P*Sau*6 (6,26 mg, 4,6 mmol) y P*Sau*8 (5,93 mg, 4,6 mmol) se disolvieron en

1:1 ACN: H_2O MilliQ (200 µL) y cada disolución se añadió gota a gota a las correspondientes soluciones de proteínas activadas purificadas (10 mg; véase la etapa 1). P*Sau*3 y P*Sau*4 se conjugaron a MP-proteína y P*Sau*6 y P*Sau*8 se conjugaron con IA-proteína a través del grupo SH. La mezcla se mantuvo bajo una ligera agitación durante 4 h a temperatura ambiente para obtener el correspondiente conjugado P*Sau*3-MP-proteína y P*Sau*4-MP-proteína o P*Sau*6-CH_2CO-proteína y P*Sau*8-CH_2CO-proteína. Para los conjugados P*Sau*6-CH_2CO-proteína y P*Sau*8-CH_2CO-proteína, el bloqueo de los átomos de yodo que no reaccionaron se realizó mediante la adición de una solución de cisteína (80 mM, 200 µL) y agitar la mezcla durante 2 h más a temperatura ambiente. Finalmente, los conjugados se purificaron mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 × 5 L) y agua MilliQ (1 × 5 L), se liofilizaron y se almacenaron a -80°C. Las alícuotas de trabajo se prepararon a 1 mg mL^{-1} en PBS y se mantuvieron a 4°C.

Análisis de la densidad de hapteno. Las densidades de los conjugados de BSA se calcularon mediante MALDI-TOF/TOF-MS comparando el peso molecular de la proteína nativa con el correspondiente MP-o IA-proteína y con el conjugado péptido-MP-proteína o péptido-CH_2CO-proteína. Los espectros de MALDI se obtuvieron mediante la mezcla de la matriz-trans-3,5-dimetoxi-4 hidroxicinámico (2 µL, 10 mg mL^{-1} en CH_3CN/H_20 70:30, ácido fórmico al 0,1%, recién preparada) y la solución de la conjugado o proteína (2 µL, 10 mg mL^{-1} en CH_3CN/H_2O 70:30, TFA al 0,1%) (la tabla 1).

Tabla 1. Densidades de hapteno de los conjugados péptido-proteína.

inmunoreactivo	d-hapteno[a]	% conjugación
PS*au*3-MP-BSA	2	5-6
P*Sau*4-MP-BSA	2	5-6
P*Sau*6-CH_2CO-BSA	6	20-17
P*Sau*8-CH_2CO-BSA	9	26-30

Los análisis se realizaron mediante MALDI-TOF/TOF-MS. [a.]Moles de hapteno por moles de proteína. [b.]La conjugación se calcula en base a la asunción que la BSA tiene entre 30-35 grupos lisina libres.

Los anticuerpos policlonales. Cuatro conejos hembra New Zealand blancos que pesaban de 1-2 Kg fueron inmunizados de acuerdo con el protocolo de inmunización previamente reportado (Anal. Chim. Acta 1997, 347 (1-2), 139-147). El antisuero obtenido de la inmunización con P*Sau*6-CH_2CO-HCH fueron etiquetados como As288 y As289 y aquellos inmunizados con P*Sau*8-CH_2CO-HCH como As290 y 291. La evolución de los títulos de anticuerpos se evaluó mediante la medición de la unión de diluciones en serie de los antisueros a placas de microtitulación recubiertas con el conjugado homólogo (P*Sau*6-CH_2CO-BSA y P*Sau*8-CH_2CO-BSA). Después de obtener un título de anticuerpo aceptable, los conejos se desangraron y la sangre se recogió en tubos vacutainer provistos de un gel de separación de suero. El antisuero se obtuvo por centrifugación 15 min a 4000 rpm y se almacenó a -80 °C en presencia de 0,02% NaN_3. Las alícuotas de trabajo se almacenaron a 4 °C.

Tratamiento Desglicosilación. La desglicosilación química del peptidoglicano (PG) a partir de preparados comerciales o de suspensiones bacterianas se realizó con ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA). PG (1 mg), P*Sau*7 (1 mg) o muestras bacterianas (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; 1 mL de 10^9 $UFCmL^{-1}$ de bacterias liofilizadas) se suspendieron en una solución 2:1 de TFMSA: anisol (0,5 mL) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió éter dietílico (1,5 mL) gota a gota a la suspensión y a continuación se añadió la mezcla a una solución 1:1 de piridina:agua Milli-Q (2,5 mL). La fase acuosa se lavó con éter dietílico (2,5 mL x 3) y se secó usando un flujo de nitrógeno durante 10 min.

Muestras de lavados broncoalvelolares (BAL) y broncoaspirados (BAS). BAL o BAS de 10 pacientes diagnosticados de no tener infección por *S. aureus* fueron tratados con ditiotreitol (DTT) para hidrolizar su estructura mucolítica. Las muestras de BAL o BAS se pesaron (50 mg) y se añadió una solución de DTT 0,1% p/v (200 μL) y se agitó durante 30 min. Después, se añadieron 200 μL de PBS y la mezcla se filtró con un filtro de nailon de 48 μm y se centrifugó (10 min, 4000 G). El sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -40°C. Una muestra blanco representativa de BAL o BAS fue preparada mediante la mezcla a volúmenes iguales de BAL o BAS con muestras provenientes de 10 individuos diagnosticados de no tener *S. aureus*, respectivamente.

Estudios del efecto Matriz

Tratamiento de desglicosilación. Se determinaron las interferencias no específicas producidas por el tipo de muestra analizada

a. Blanco Un extracto acuoso blanco, preparado usando el procedimiento de desglicosilación en ausencia de muestra, se usó para preparar las curvas de calibración P*Sau*7 PBST-D y se utilizó para comparar la respuesta en el ELISA, con respecto a la misma curva preparada en PBST,

b. BAL o BAS: se prepararon las curvas de calibración en BAL o BAS y se evaluó por ELISA para comparar el paralelismo con la curva estándar preparada en PBST-D. (Véase la figura 1B y tabla 3)

Muestras dopadas no-desglicosiladas: a. Muestras preparadas en tampón. Se dopó PBS a varias concentraciones de P*Sau*7, PG y *S. aureus* y se midieron los equivalentes de inmunorreactivos de P*Sau*7en la curva de referencia P*Sau*7 PBT mediante ELISA (figura 4 y 6 y tabla 4).

Muestras dopadas desglicosiladas: a. Muestras preparadas en tampón: Se dopó PBS a varias concentraciones de P*Sau*7, PG, *S. aureus*, *P. aeruginosa* o *E. coli*. Se desglicosilaron como se describe anteriormente y se midieron los equivalentes de inmunorreactivos de P*Sau*7en la curva de referencia P*Sau*7 PBST-D mediante ELISA usando el procedimiento descrito para las muestras desglicosiladas (tabla 4 y figura 4 para PG; figura 5 *P. aeruginosa* y *E. coli*) **b. Muestras dopadas de BAL o BAS.** Se dopó BAL o BAS a varias concentraciones de *S. aureus* y se midieron en el ELISA P*Sau*7 PBST-D. (Figura 6 para *S. aureus* dopado en PBS, BAL o BAS).

ELISA competitivo indirecto: Se seleccionaron las concentraciones apropiadas de los antisueros (As288-As291) y de los bioconjugados (P*Sau*3-MP-BSA, P*Sau*4-MP-BSA, P*Sau*6-CH_2CO-BSA o P*Sau*8-CH_2CO-BSA) para establecer las pruebas ELISA tras un ensayo de placa de titulación 2D que se realizó como está descrito (Anal. Chim Acta **1997**, 347 (1-2), 139) (tabla 2). Con la mejor combinación As/bioconjugado se estableció el siguiente procedimiento cuantitativo:

Las placas de microtitulación se tapizaron con P*Sau*3-MP-BSA (0.125 mg mL^{-1} en tampón de tapizado, 100 µL$pocillo^{-1}$) 4 horas a 25°C. Después, las placas se lavaron con PBST (4 x 300 µL $pocillo^{-1}$) y se añadieron las soluciones estándares del péptido (P*Sau*5 o P*Sau*7, desde 1,500 nM a 0 nM en PBT) o PG (de 200 µg mL^{-1} a 0 µg mL^{-1} en PBST) o muestras (suspensiones bacterianas), previamente preincubados con el

antisuero (As291, 1/6000 diluido en PBT) durante 30 min a temperatura ambiente, (100 µL pocillo^{-1}). Después de 30 min a temperatura ambiente, las placas se lavaron como antes y se añadió la solución anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µL pocillo^{-1}) y se incubó durante 30 min más. Después de otro ciclo de lavados, se añadió la solución de sustrato (0,01% TMB (3,3 ', 5,5'-tetrametilbenzidina) y 0,004% de H_2O_2 en tampón citrato) (100 µL pocillo^{-1}), y la reacción enzimática se detuvo después de 30 min a temperatura ambiente con $H_2SO_4$4N (50 µL pocillo^{-1}). Las absorbancias se midieron a 450 nm.

Cuando las muestras a medir previamente habían sido tratadas con TFMSA, el tapizado de las microplacas se realizó con P*Sau*3-MP-BSA (1,5 mg mL^{-1} en tampón de tapizado, 100 µL pocillo^{-1}) y las muestras o las soluciones estándar P*Sau*7 (de 3350 nM a 0 nM en PBST-D, 90 µL pocillo^{-1}) previamente preincubadas con As291 (1/500 diluido en PBT, 10 µL pocillo^{-1}).

Tabla 2: Parámetros inmunoquímicos del ELISA competitivo indirecto usando soluciones de PG como estándares.

Hapteno de inmuniza-ción	Ensayo	Abs_{max}	Abs_{min}	IC_{50} (µg mL^{-1})	Pendiente	R^2
P*Sau*6	As288/P*Sau*4-MP-BSA	1,033	0,225	3,08	-1,32	*0,990*
	As288/P*Sau*3-MP-BSA	1,055	0,251	2,63	-1,75	*0,982*
	As288/P*Sau*8-CH_2CO-BSA	0,922	0,331	4,91	-1,06	*0,993*
	As288/P*Sau*6-CH_2CO-BSA	0,936	0,208	2,58	-1,52	*0,984*
	As289/P*Sau*4- MP-BSA	0,820	0,208	2,58	-1,21	*0,977*
	As289/P*Sau*3- MP-BSA	1,343	0,226	1,23	-0,92	*0,989*
	As289/P*Sau*8-CH_2CO-BSA	0,926	0,263	1,68	-0,98	*0,995*
	As289/P*Sau*6-CH_2CO-BSA	1,167	0,325	2,26	-1,15	*0,995*
P*Sau*8	As290/P*Sau*4- MP-BSA	0,718	0,154	2,07	-1,73	*0,977*
	As290/P*Sau*3- MP-BSA	1,125	0,221	2,69	-1,66	*0,989*
	As290/P*Sau*6-CH_2CO-BSA	1,441	0,239	3,44	-1,32	*0,995*
	As290/P*Sau*8-CH_2CO-BSA	1,661	0,296	6,61	-1,14	*0,995*
	As291/P*Sau*4- MP-BSA	0,806	0,149	1,20	-1,31	*0,987*
	As291/P*Sau*3- MP-BSA	1,340	0,165	1,59	-1,38	*0,993*

As291/P*Sau*6-CH_2CO-BSA	1,445	0,274	6,66	-1,02	*0,997*
As291/P*Sau*8-CH_2CO-BSA	1,790	0,299	12,43	-0,78	*0,991*

Tabla3. Parámetros del ELISA desarrollado basado en microplaca, utilizando distintos analitos (P*Sau5*, P*Sau7* and PG) y distintas condiciones (PBT and PBST-D).

Analito➤	**P*Sau5***	**P*Sau7***				**PG[a]**
Condiciones del ensayo➤	**PBT[b]**	**PBT[c]**	**PBST-D[c,d]**	**BAL Desglic.[c,d]**	**BAS Desglic.[c,d]**	**PBT[b]**
A_{max}	0,926±0,010	0,926±0,010	1,609±0,039	1,696±0,043	1,612±0,061	0,752±0,02
A_{min}	0,059±0,006	0,059±0,006	0,089±0,044	0,166±0,042	0,152±0,056	0,078±0,019
Pendiente	-1,14±0,06	-1,14±0,06	-1,26±0,09	-1,17±0,14	-1,27±0,22	-1,15±0,13
IC_{50}, ng mL^{-1}	0,86±0,03	0,85±0,06	7,62±0,54	18,92±1,55	14,98±2,20	1002±920
nM o $nmolKg^{-1}$	0,69±0,02[e]	0,72±0,05[e]	6,42±0,46[e]	128,10±10,75[f]	101,20±14,93[f]	-
LOD, ng mL^{-1}	0,11±0,01	0,13±0,01	1,68±0,11	1,13±0,43	1,11±0,22	120±90
nM o $nmolKg^{-1}$	0,10±0,01[e]	0,11±0,01[e]	1,37 ± 0,09[e]	19,08±7,35[f]	18,8±3,7[g]	-
R_2	0,998±0,001	0,999±0,001	0,931±0,154	0,958±0,126	0,878±0,21	0,995±0,004

[a]El peso molecular del PG no se conoce. Los ensayos se realizaron usando tres pocillos de replicado bajo las condiciones mostradas en la tabla. PBT indica que el protocolo del inmunoensayo se usó para muestras no-desglicosiladas, mientras PBST-D indica que el ensayo se realice bajo las condiciones de muestras desglicosiladas. [b]Los valores mostrados son el promedio y la desviación estándar de los parámetros de la curva de calibración obtenidos en dos días diferentes. [c]Los valores mostrados son el promedio y la desviación estándar de los parámetros de la curva de calibración obtenidos en tres días diferentes. [d]Se ha aplicado un factor de multiplicación de 2.5 a los valores de IC_{50} y LOD correspondiente al tratamiento de desglicosilación. [e]Los valores se expresan en nM. [f]Los valores se expresan en nmoles de PSau7Kg^{-1} BAL. [g]Los valores se expresan en nmoles de PSau7Kg^{-1} BAS.

RESULTADOS

Con el fin de mimetizar una parte del Peptidoglicano (PG) de la pared bacteriana de *S. aureus* se sintetizaron dos epítopos de péptidos correspondientes a las estructuras P*Sau*5 y P*Sau7* que servirían como analitos en el proceso de optimización del método de detección de *S. aureus*. P*Sau*5, contiene la secuencia de DAla-DAla del peptidoglicano de la pared bacteriana de *S. aureus*, y P*Sau7* contiene un sólo residuo

DAla. Para la síntesis de estos péptidos, ambos residuos terminales carboxi y amino fueron amidados (-$CONH_2$ y CH_3CONH-, respectivamente). Sólo en el caso del segundo residuo DAla del P*Sau*5 el grupo carboxiterminal se dejó libre.

Los haptenos de inmunización P*Sau*6 y P*Sau*8 fueron diseñados para mimetizar y maximizar el reconocimiento de estos epítopos mediante la colocación de un residuo LCys en el extremo amino, junto a uno de los residuos LAla que están vinculados a los residuos MurNAc de PG.

Otros dos haptenos peptídicos (P*Sau*3 y *PSau4*), diferentes de los haptenos de inmunización, fueron diseñados y sintetizados introduciendo ligeras modificaciones con respecto al epítopo peptídico P*Sau*5, para ser utilizados como competidoresy mejorar la capacidad de detección del ensayo. P*Sau*3 es muy similar al hapteno de inmunización P*Sau*6 excepto por el residuo DGln que sustituye al D-γGlu-NH_2, que está presente en la estructura del PG y en P*Sau*6. Por lo tanto, como se puede observar en la P*Sau*3, el DGln forma un enlace amida normal con el ácido amino vecino a través del grupo α-COOH, a diferencia de D-γGlu-NH_2 del P*Sau*6, que está enlazado a través del grupo γ-COOH, como en la estructura real del PG de *S. aureus*. P*Sau*4 también posee esta modificación, pero además, el residuo Cys está situado en el lado opuesto dejando el DAla-DAla terminal más accesible para el reconocimiento de anticuerpos. Se obtuvo una colección de cuatro bioconjugados proteína-péptido competidores con diferentes grados de heterología (P*Sau*4-MP-BSA>P*Sau*3-MP-BSA> P*Sau*6-CH_2CO-BSA ≈ P*Sau*8-CH_2CO-BSA) para el desarrollo del inmunoensayo competitivo.

La afinidad de los antisueros para los diferentes bioconjugados se ensayó en experimentos de titulación. Todos los antisueros mostraron una mayor afinidad por los conjugados homólogos. Posteriormente, las combinaciones de antisueros/bioconjugado que mostraron buenos títulos fueron probados por su capacidad de reconocer el PG de *S. aureus*. Como resultado de ello, se obtuvieron dieciséis ensayos inmunoquímicos con detectabilidades similares (la tabla 2). Ambos haptenos de inmunización P*Sau*6 y P*Sau*8 resultaron obtener buenos inmunoensayos, lo que indica que ambos epítopos peptídicos son igualmente accesibles para el reconocimiento del anticuerpo en el PG. Sin embargo, si bien la heterología del hapteno no jugó un papel importante para los anticuerpos de P*Sau*6, para aquellos

contra P*Sau*8, la detectabilidad fue ligeramente mejor utilizando competidores heterólogos (Tabla 2).P*Sau*3-BSA/As291 fue seleccionado para estudios posteriores, ya que fue una de las combinaciones que muestran un mejor valor de IC_{50} y relación Abs_{min}/Abs_{Max}.

Estudio parámetros físico-químicos en el ensayo

Con el objetivo de evaluar el efecto de los parámetros físico-químicos en el ensayo y mejorar la detectabilidad de la pared celular de *S. aureus*, se evaluaron parámetros como el pH (5,5 a 9,5), la fuerza iónica (1,5 a 52,2 mS cm^{-1}), el tanto por ciento de Tween 20 (0-0,1%) del tampón de ensayo como otros parámetros tales como la longitud de la etapa competitiva (10-60 min) o la introducción de una fase de preincubación (0-60 min) del analito con el antisuero. Como se puede observar en la figura 2, el ensayo es estable entre valores de pH de 5,5 y 8,5, valores de fuerza iónica bajos mejoran la detectabilidad del ensayo y el efecto el Tween20 no afecta significativamente el ensayo (figura 2A, 2B y 2C). Por otra parte, la introducción de una etapa de preincubación e incrementando el tiempo de la etapa de competencia, mejoran la detectabilidad del ensayo (figura 2D y 2E). Por lo tanto, se estableció una preincubación de 15 min seguido de 30 min de etapa competitiva, utilizando un tampón de ensayo con una fuerza iónica de 1,5 mS cm^{-1}. Bajo estas condiciones, el ELISA es capaz de alcanzar un LOD de 120 ± 90 ng ml^{-1}(≈ 3 $ngpocillo^{-1}$; N = 2 días) con una IC_{50} de 1002 ± 920 ng mL^{-1} (N = 2 días) de PG (figura 2A y tabla 3), y el tiempo total del ensayo es de 2,5 h, usando sólo 25 µLde muestra.

Establecimiento de un ensayo inmunoquímico de tipo ELISA para la detección de epítopos peptídicos en la pared bacteriana de *S. aureus*

Debido a la falta de estandarización de los preparados comerciales de PG, que son diferentes en función del procedimiento utilizado para su extracción de la pared celular, en los estudios dirigidos a la determinación de preparados bacterianos se decidió usar los epítopos P*Sau*7 o P*Sau*5 como estándares de cuantificación. Contrariamente a los preparados comerciales, estas estructuras están bien definidas y químicamente caracterizadas, lo cual proporciona resultados más reproducibles que confieren una mayor fiabilidad al ensayo.

Como se puede observar en la Figura 1B y la tabla 3, los epítopos de péptido seleccionado (P*Sau*5 y P*Sau*7) fueron reconocidos en un grado comparable con valores de IC_{50} similares de alrededor de 0,7 nM (0,8 ng mL^{-1}). Se escogió P*Sau*7 para calibrar el ensayo, expresando los resultados como equivalentes de inmunorreactividad de P*Sau*7 (equiv IR PSau7). Por otra parte, el ensayo podría ser utilizado para caracterizar losdiferentes lotes de PG como una función de su respuesta inmunoquímica en el ensayo, expresados como equivs IR de P*Sau*7.

Desglicosilación del peptidoglicano para incrementar la detectabilidad del método ELISA

El objetivo era desarrollar una herramienta inmunoquímicade diagnóstico capaz de detectar infecciones causadas por *S. aureus* sin necesidad de pre-enriquecimiento de la muestra.

Inicialmente, midiendo suspensiones de diluciones seriadas preparadas en PBS, se observó que en estas condiciones sólo los preparados con densidades celulares superiores a 10^7 UFC mL^{-1} podían ser detectados con eficacia. Aunque esta detectabilidad se encuentra cerca de otros ensayos reportados mediante determinaciones inmunoquímicas de *S. aureus* (Diagn Microbiol Infect Dis 2013, 75 (1), 28-36), esta detectabilidad es insuficiente para fines de diagnóstico y por esta razón otros autores han desarrollado métodos de amplificación y otras técnicas para mejorar la sensibilidad.

Para incrementar la detectabilidad del ensayo los inventores establecieron que los epítopos peptídicos estuvieran más accesibles para el anticuerpo mediante la rotura o desglicosilación de la pared celular del PG. Los métodos de escisión de la pared celular bacterianas se han estudiado ampliamente para elucidar la estructura PG o incluso para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos pero no se han descrito para incrementar la detectabilidad del ensayo. El método de desglicosilación utilizado se basó en la hidrólisis química con TFMSA, aunque se podrían haber utilizado otros métodos descritos en la literatura.El TFMSA es no dependiente de las mutaciones, el enlace amida de los péptidos no se ve afectado y solo rompe los enlaces de las fracciones de glicano.

Teniendo en cuenta que el tratamiento TFMSA podría alterar no sólo el PG, sino también las características físico-químicas de la muestra resultante, en una primera instancia, se evaluó el potencial de interferencias no específicas causadas por este tratamiento en el ELISA P*Sau3*-MP-BSA/As291. Para este propósito, se realizó el tratamiento de desglicosilación tal y como se describe en la sección experimental pero en ausencia de matriz, y se empleó la solución final para preparar las curvas de calibración. Como se puede observar en las figuras 3A y 3B, la señal fue completamente inhibida en este medio. El extracto tuvo que ser diluido al menos 80 veces con el fin de tener un ensayo utilizable, disminuyendo sustancialmente la detectabilidad. En su lugar, se optó por volver a ajustar la concentración de los reactivos inmunitarios en este medio de desglicosiliación, llevando a cabo experimentos 2D utilizando el extracto TFMSA diluido 1/4 en PBT (pH de 5,5 y una conductividad de 28 mS cm^{-1}).

La figura 1B muestra la curva de calibración registrada bajo estas condiciones y la Tabla 1 (columna titulada PBST-D) muestra los parámetros extraídos del ajuste de la curva de calibración a una ecuación de cuatro parámetros. El LOD para P*Sau7* en la matriz fue 1,37nM, un valor mayor que en el tampón de ensayo (figura 1B), pero suficientemente buenopara seguir con nuestros estudios.

La robustez de ensayo, evaluada mediante la ejecución de las curvas de calibración de P*Sau7* durante varios días (N = 3 días) demostró que el ensayo es reproducible. Así, en el valor de IC_{50}, el coeficiente de variación (% CV) es 7,1%, mientras que en el LOD es de 6,7 %. (figura1B y tabla 3, columna titulada PBST-D).

Recuperación de P*Sau7* en el tratamiento de desglicosilación

Por otra parte, la recuperación de la desglicosilación se evaluó mediante el dopaje de muestras a concentraciones conocidas de P*Sau7*, obteniendo recuperaciones próximas al 100%. Estos resultados indican que los epitopos peptídicos no se ven alterados por el tratamiento, ya que los equivalentes de inmunorreactividad (IR equiv.) medidos antes y después del tratamiento no difieren significativamente (tabla 4).

Tabla 4. Recuperación de la desglicosilación química.

	Medido, nM*(% recuperación)*	
dopado, nM	**PBST**	**PBST-D**
22	19,5 ± 0,88 (*88*)	21,1 ± 0,99 (*96*)
23	25,1 ± 1,05 (*109*)	26,5 ± 0,98 (*115*)

Las muestras de doparon con P*Sau7*y se midieron por ELISA antes y después del tratamiento de desglicosilación. Los resultados mostrados son el promedio y la correspondiente desviación estándar de tres muestras dopadas a la misma concentración, cada uno de ellos medido por triplicado en tres pocillos de la placa.

Muestras de preparados comerciales de PG y de varias suspensiones bacterianas (*S. aureus, P. aeruginosa* y *E. Coli*, 10^8-10 UFC mL^{-1}) se desglicosilaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se midieron los equiv IR de P*Sau7* antes y después del tratamiento.El tratamiento permitió aumentar significativamente la señal inmunoquímica en el preparado PG comercial (figura 4) y en muestras de cultivos de *S. aureus* (figura 6) lo que indica que el procedimiento de la desglicosilación incrementa de manera eficiente la liberación de epítopos de péptidos que reaccionan con los anticuerpos. Mediante este procedimiento de desglicosilación, *S. aureus* puede detectarse en concentraciones hasta 10^4 UFC mL^{-1} sin pre-enriquecimiento del cultivo celular (t-Test $p< 0.05$ ($p= 0.04$) respecto a la concentración celular de *S. aureus* de 0 CFU mL^{-1}). En contraste, las muestras de *E. coli* y *P. aeruginosa* no muestran ninguna respuesta, ni antes ni después del tratamiento con TFMSA, en concentraciones de hasta 10^8 y 10^7 UFC mL^{-1} (figura 5) lo que demuestra la especificidad del protocolo inmunoquímico que se presenta aquí.

Evaluación en muestras reales

La incidencia y la importanciade*S. aureus* en las vías respiratorias condujeron a la evaluación de la funcionalidad de esta técnica inmunoquímicaen muestras de BAL y BAS. Así, una mezcla demuestras de BAL o BAS obtenidas de pacientes no infectados por *S. aureus* se utilizaron para evaluar el rendimiento del ensayo.

Después de un tratamiento simple de BAL y BAS con DTT seguido del tratamiento de desglicosilación se vio que bajo estas condiciones el ensayo seguía funcionando bien. Las muestras BAL y BAS desglicosiladas mostraron una respuesta similar

comparándola con la curva ELISA de P*Sau*7 PBST-D (figura 1B) sin necesidad de realizar otro tratamiento para minimizar el efecto matriz.

La fracción peptídica específica del PG de*S. aureus* puede ser detectada en muestras de BAL y BAS con un LOD de 19,08 ± 7,35 nmoles Kg^{-1} (N = 3 días) y 18,8 ± 3,70 nmoles Kg^{-1} (N = 3 días), respectivamente.

Se prepararon unas muestras de BAL y BAS dopadas con *S. aureus* a diferentes concentraciones. Las muestras se trataron como antes y después se valoraron con la curva de referencia ELISA P*Sau*7 PBST-D. Como se puede observar en la figura 6, la respuesta inmunoquímica de las muestras de BAL y BAS era muy similar a la obtenida a la de las muestras de *S. aureus* dopadas en PBST, excepto por el hecho de que la detectabilidad lograda fue menor (10^5 BAS y 10^6 para BAL), pero sigue siendo útil para el diagnóstico, teniendo en cuenta que el ELISA descrito no necesita pasos de cultivo de pre-enriquecimiento de células para alcanzar esta detectabilidad.

En la fibrosis quística (FQ), la bronquitis y la neumonía de pacientes a menudo se han reportado cargas bacterianas alrededor de 10^6 UFC mL^{-1}. Como ejemplo, Corne *et al.* (J Clin Microbiol 2005, 43, 3491) en un estudio con pacientes con neumonía reportó concentraciones > 10^4 UFC mL^{-1} de *S. aureus* a partir de cultivos de BAL y concentraciones > 10^7 UFC mL^{-1} a partir de cultivos de BAS de los pacientes con neumonía. En pacientes con FQ, *S. aureus* es uno de los primeros agentes patogénicos que colonizan las vías respiratorias y las cargas bacterianas alcanzan hasta 10^8 UFC mL^{-1} en el esputo (J Clin Microbiol 2002, 40, 2300).

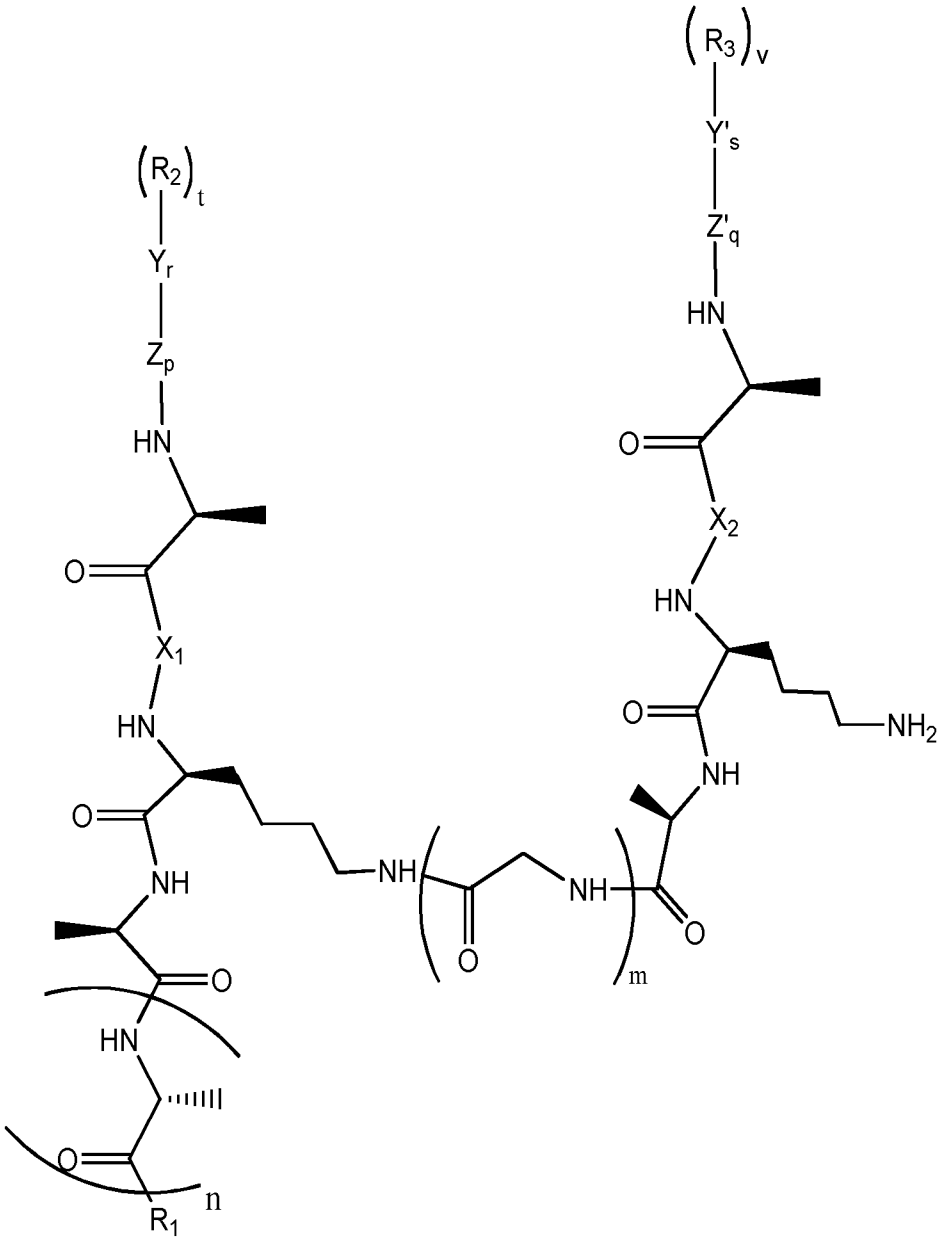
En la presente invención se presenta por primera vez un método de detección basado en un ELISA competitivo, utilizando anticuerpos específicos del PG de *S. aureus*, capaz de detectar este microorganismo a niveles de 10^4 UFC mL^{-1}, sin pre-enriquecimiento en cultivo celular. Documentos del estado de la técnica que abordaron el desarrollo de anticuerpos contra el PG de *S. aureus* no muestran resultados suficientes para demostrar la posibilidad de detectar bacterias en muestras clínicas, y con frecuencia sólo muestran los datos relativos a la detectabilidad de los preparativos de PG o de la pared celular.

En este aspecto, la estrategia usada en este documento para generar anticuerpos contra epítopos sintéticos específicos del PG ha permitido la creación de un ensayo inmunoquímico con una mejor detectabilidad y capacidades de rendimiento de muestreo más alta, reduciendo significativamente el tiempo de ensayo y el volumen de muestra necesario. Así, mientras este ELISA es capaz de detectar 3 ng (120 ng mL^{-1}) de PG (sin desglicosilación) con tan sólo 50 µl y 2,5 h, el ensayo de aglutinación de látex reportado por Seidl y Schleife (European J. Biochem1977, 74, 353-363) detecta 10 ng usando 1 mL de muestra (el volumen total de ensayo es de 11 mL) después de 14 h (2 horas a 56°C), y Wergeland *et al.* (J Immunol Methods1987, 104, 57-63) desarrolló un ELISA sandwich alcanzando un LOD de 200 ng mL^{-1} después de un tiempo de ensayo total de aproximadamente 21 h. Más recientemente, Sandhu *et al.* (Analyst 2012, *137*, 1130-1136) han reportado un ELISA de 4h basado en la detección de PG previamente adsorbido las placas de pocillos que alcanzan un valor detectabilidad que es dos órdenes de magnitud mayor que el ensayo aquí descrito.

Además, el ELISA aquí descrito, detecta *S. aureus* directamente (sin cultivo de células o pre-enriquecimiento) en muestras clínicas a densidades celulares, que puede ser útil para el diagnóstico en casi 2,5 horas (1 h de tratamiento de la muestra y 1,5 h para el ensayo). Por otra parte, el ensayo es fácil de realizar, tiene capacidad para un elevado análisis de muestras y necesita muy pequeños volúmenes de muestra.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde:

R_1 se selecciona de entre OH y NHR'; donde R' se selecciona de entre H o alquilo(C_1-C_4);

n es un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

m es un número entero seleccionado de entre 1 y 7;

X_1 y X_2 se seleccionan, cada uno independientemente, de entre D-Glu, D-Gln, D-γ-Glu y D-γ-Gln;

Z y Z' se seleccionan, cada uno independientemente, de entre un aminoácido seleccionado de la lista que consiste en Gly, Ala, Leu, Ile y Val; p y q son, cada uno independientemente, un número entero seleccionado de entre 0 y 1;

Y e Y' se seleccionan, cada uno independientemente, de entre R_4, COR_4 y Cys, opcionalmente la cisteina puede contener un grupo protector de tioles;

R_2 y R_3 se seleccionan, independientemente, de entre H, alquilo(C_1-C_4) y CO-alquilo(C_1-C_2);

r, s, t o v son, independientemente,un número entero seleccionadode entre 0 y 1;

R_4 es un alquilo(C_1-C_5), sustituido con un grupo -SH, -halógeno, -CΞCH, -N_3 o –COR_5;

R_5 se selecciona de entre H o OR''; donde R'' se selecciona de entre H o alquilo(C_1-C_4);

con la condición de que:

si r es 1, s es 0,

si s es 1, r es 0, y

si Y o Y' se selecciona entre R_4 o COR_4 entonces t ó v, respectivamente es 0.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde p y q son 0.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde m es 5.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde n es 0.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R_1 es NHR' y R' se selecciona de entre H o metilo.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde n es 1.

7. Compuesto según la reivindicación anterior, donde R_1 es OH.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde X_1 y X_2 son iguales.

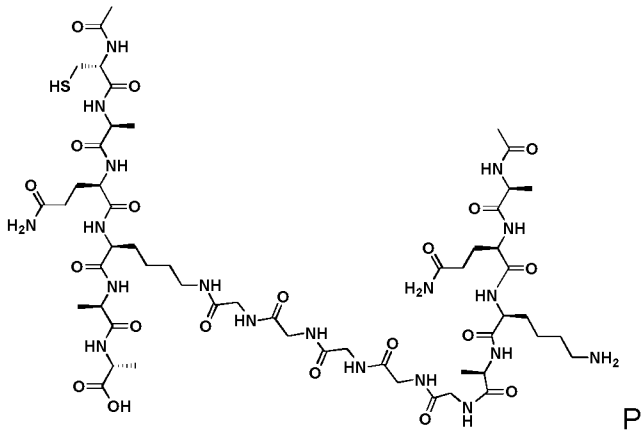
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde X_1 y/o X_2 son D-Gln o D-γ-Gln.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde Y o Y' son Cys.

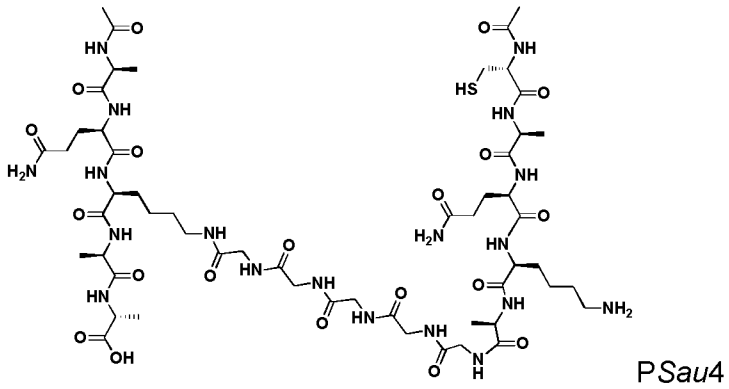
11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_2 y/o R_3 son el grupo-CO-alquilo(C_1-C_2)

12. Compuesto según la reivindicación anterior, donde R_2 y/o R_3 son el grupo $-COCH_3$.

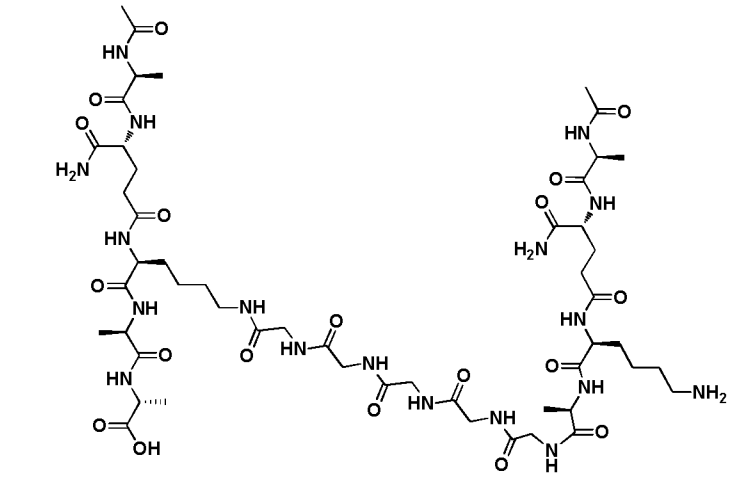
13. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de entre



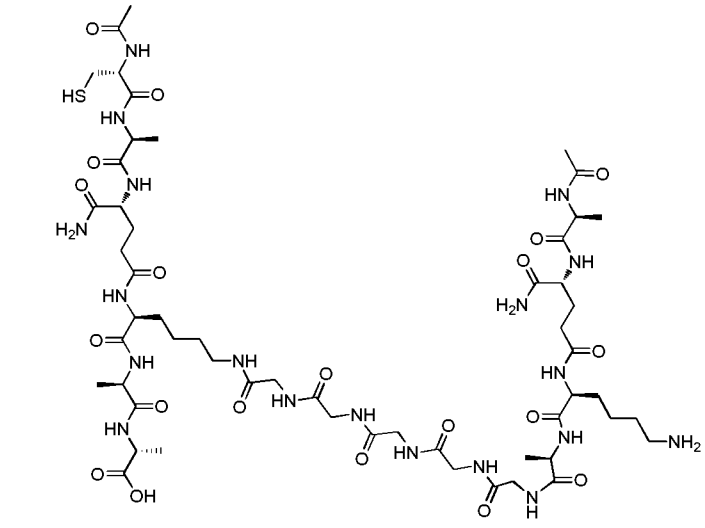
PSau3



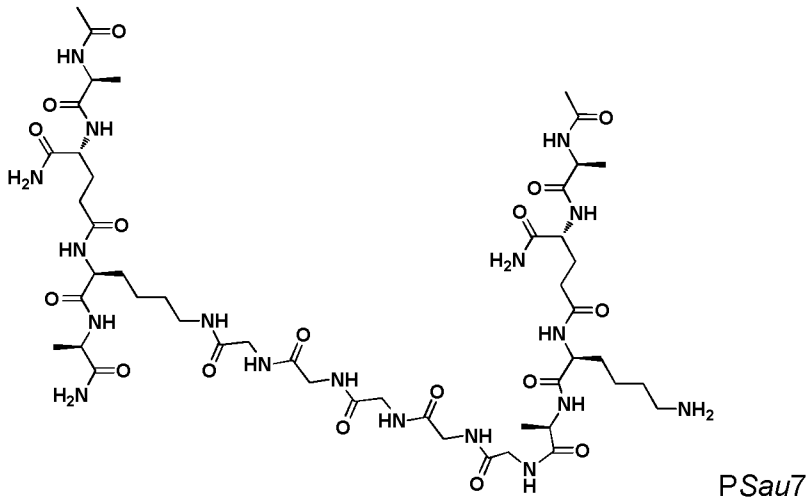
PSau4



PSau5

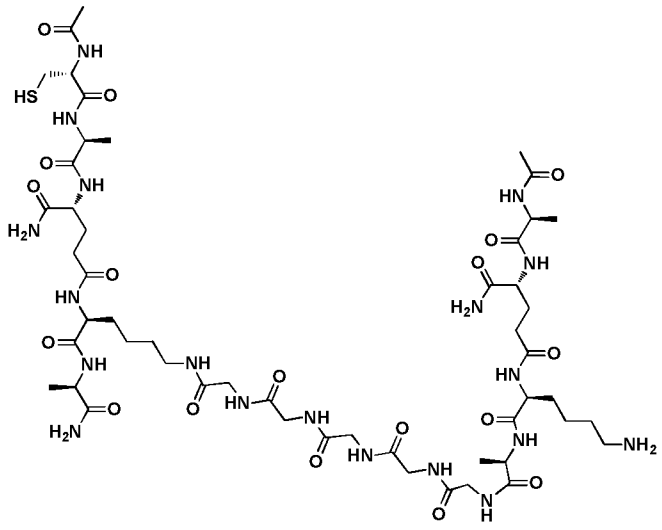


PSau6



PSau7

y



P*Sau*8

14. Compuesto según la reivindicación anterior, donde el compuesto es P*Sau*3, P*Sau4,* P*Sau6* o P*Sau*8.

15. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 como hapteno.

16. Conjugado que comprende al menos un hapteno seleccionado de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 junto con al menos un segundo componente seleccionado de la lista que consiste en: una macromolécula, preferiblemente una proteína o un fragmento de la misma, un oligonucleótido o un polisacárido; una etiqueta detectable y un soporte.

17. Conjugado según la reivindicación 16, donde el segundo componente se selecciona de una macromolécula, preferiblemente una proteína.

18. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17 donde la macromolécula se selecciona de la lista que consiste en: hemocianina de cangrejo herradura (HCH), hemocianina de lapa (KLH), albumina de suero bovino (BSA), peroxidasa de rábano (HRP), ovoalbúmina (OVA), y conalbúmina (CONA), preferiblemente HCH y BSA.

19. Uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18 para la obtención de anticuerpos.

20. Anticuerpo obtenido mediante la inmunización con un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18.

21. Anticuerpo según la reivindicación 20 donde el anticuerpo es monoclonal o policlonal.

22. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21 donde además el anticuerpo está unido a un agente de marcaje.

23. Antisuero que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22.

24. Uso del hapteno seleccionado de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o del conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 o del antisuero según la reivindicación 23 para la detección de *S. aureus* o un analito derivado en una muestra.

25. Uso según la reivindicación anterior, donde la muestra se selecciona de una muestra biológica aislada de un sujeto, una muestra alimentaria o ambiental.

26. Método *in vitro* para detectar*S. aureus* o un analito derivado de *S. aureus* en una muestra que comprende la utilización del anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 o del antisuero según la reivindicación 23 y la detección de la unión de dicho anticuerpo o antisuero a *S. aureus* o un analito derivado de *S. aureus*.

27. Método según la reivindicación 26que además comprende el uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27 donde la detección se realiza mediante una técnica inmunoquímica.

29. Método según la reivindicación 28 donde la técnica inmunoquímica es un ELISA, preferiblemente ELISA competitivo indirecto.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29 donde la muestra se selecciona de una muestra biológica aislada de un sujeto, una muestra alimentaria o ambiental.

31. Método según la reivindicación 30, donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en: sangre, suero, plasma, saliva, orina,esputo, BAL y BAS.

32. Kit o dispositivo que comprende al menos un hapteno seleccionado de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 o un antisuero según la reivindicación 22 o cualquiera de sus combinaciones.

33. Kit o dispositivo según la reivindicación 32 en donde el hapteno, el conjugado o el anticuerpo están inmovilizados sobre un soporte sólido.

34. Kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 32 o 33, que comprende al menos un conjugado y un anticuerpo.

35. Uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34 para la detección de *S. aureus* en una muestra biológica aislada, alimentaria o ambiental.

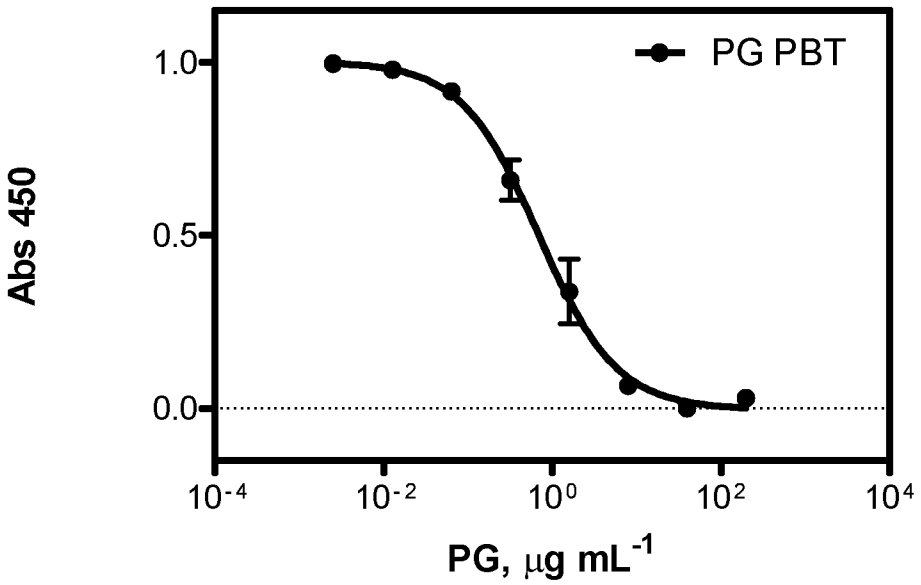

PG PBT
1.0
0.5
0.0
Abs 450
10-4
10-2
100
102
104
PG, μg mL-1

FIG. 1A

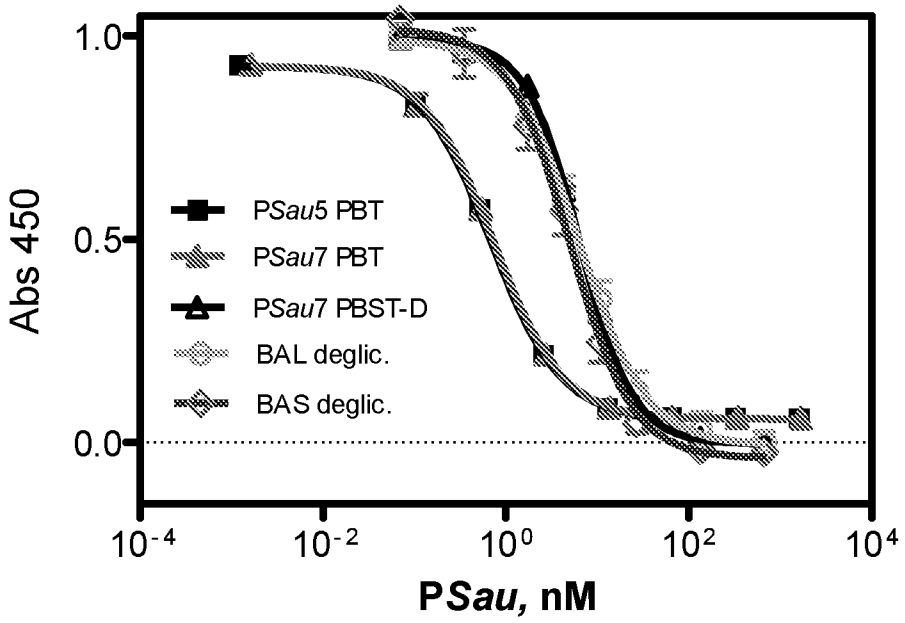

PSau5 PBT
PSau7 PBT
PSau7 PBST-D
BAL deglic.
BAS deglic.
1.0
0.5
0.0
Abs 450
10-4
10-2
100
102
104
PSau, nM

FIG 1B

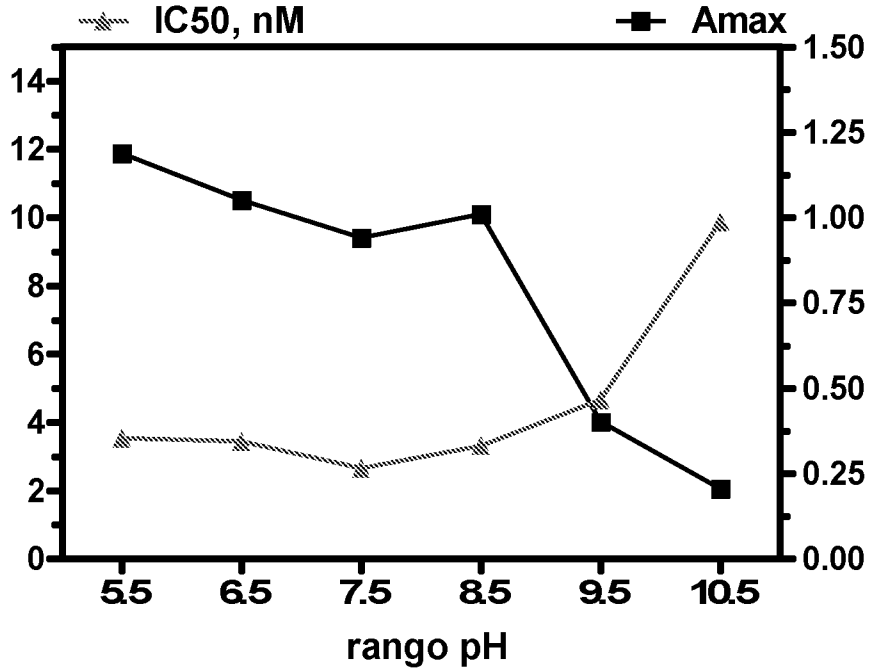

IC50, nM
Amax
14
12
10
8
6
4
2
0
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
5.5
6.5
7.5
8.5
9.5
10.5
rango pH

FIG 2A

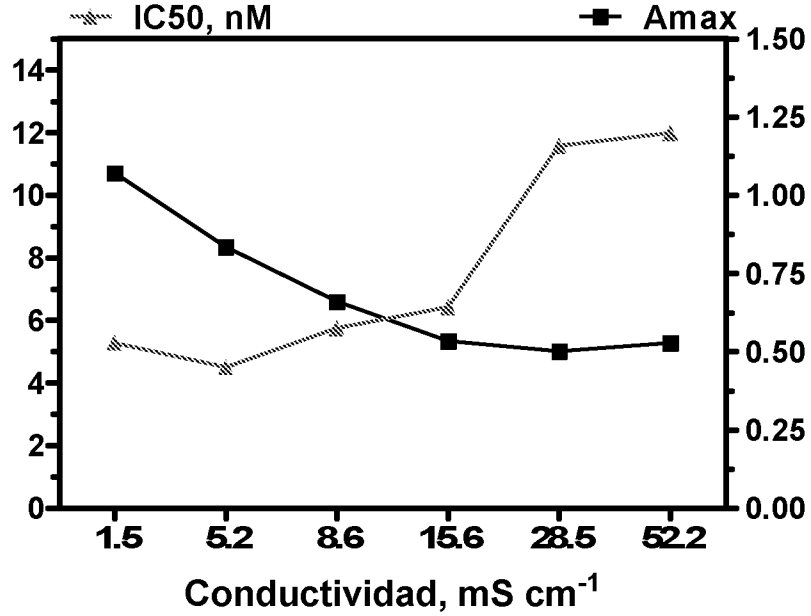

IC50, nM
Amax
14
12
10
8
6
4
2
0
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1.5
5.2
8.6
15.6
28.5
52.2
Conductividad, mS cm-1

FIG 2B

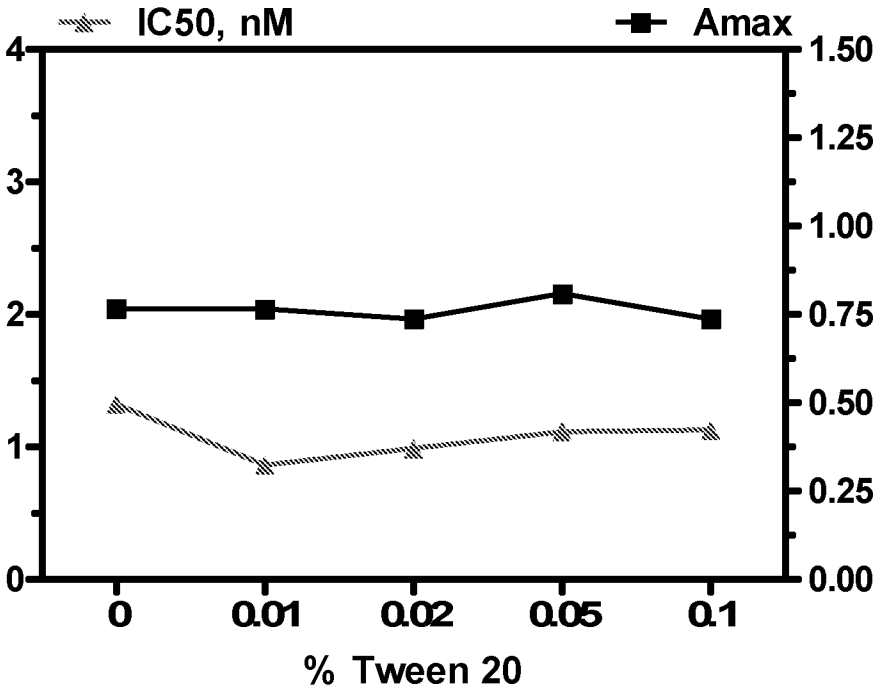

IC50, nM
Amax
4
3
2
1
0
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
0.01
0.02
0.05
0.1
% Tween 20

FIG 2C

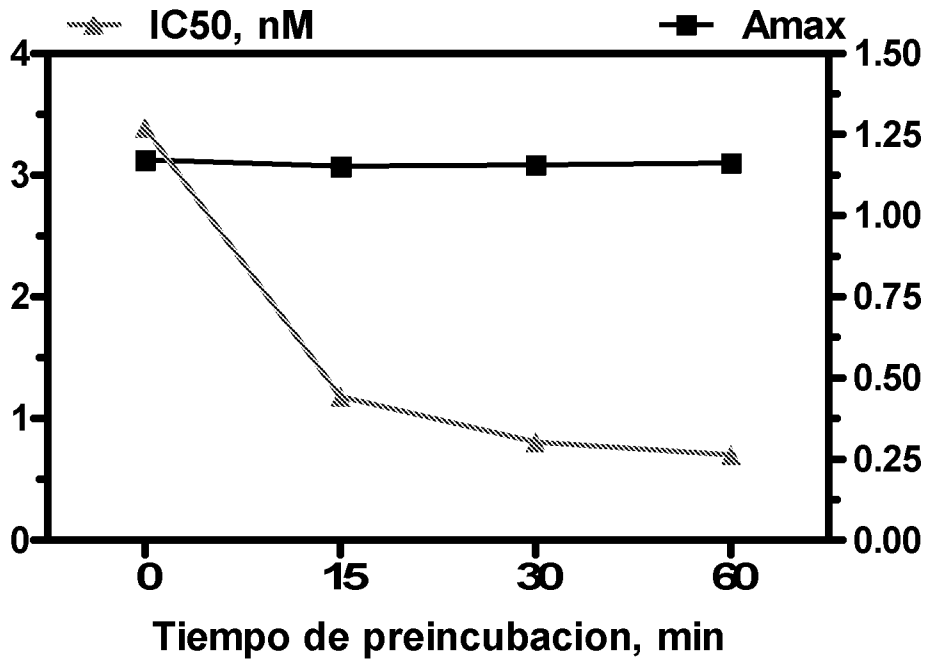

IC50, nM
Amax
4
3
2
1
0
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
15
30
60
Tiempo de preincubacion, min

FIG 2D

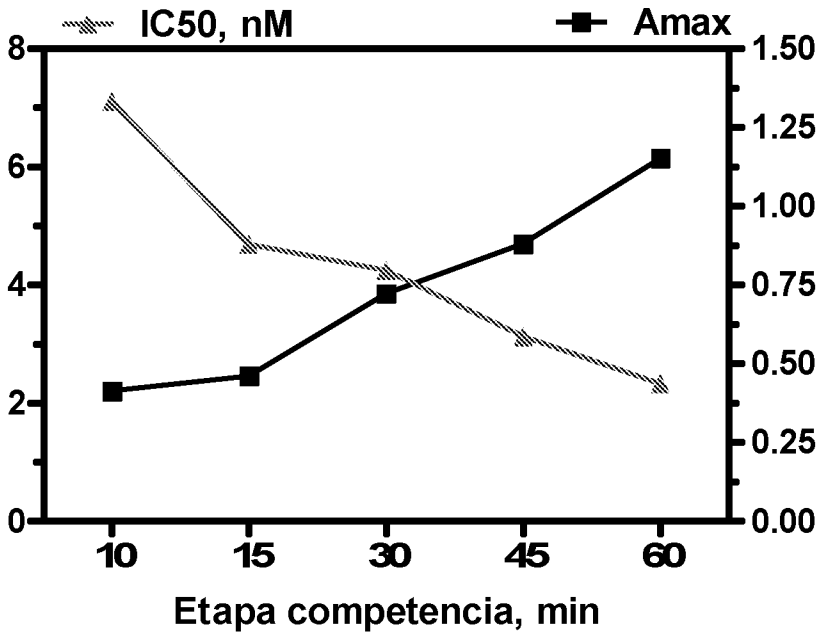

IC50, nM
Amax
8
6
4
2
0
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10
15
30
45
60
Etapa competencia, min

FIG 2E

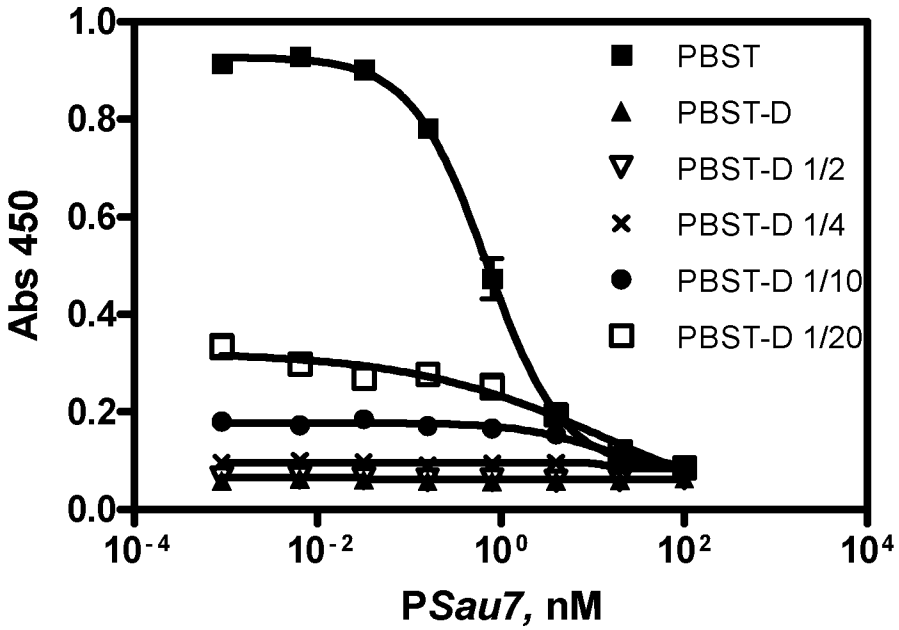

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs 450
PBST
PBST-D
PBST-D 1/2
PBST-D 1/4
PBST-D 1/10
PBST-D 1/20
10-4
10-2
100
102
104
PSau7, nM

FIG 3A

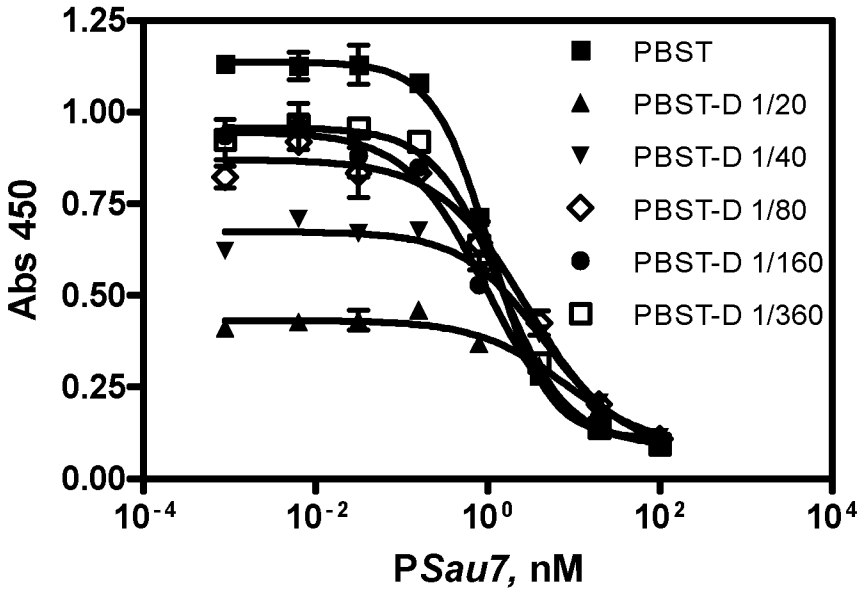

1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Abs 450
PBST
PBST-D 1/20
PBST-D 1/40
PBST-D 1/80
PBST-D 1/160
PBST-D 1/360
10-4
10-2
100
102
104
PSau7, nM

FIG 3B

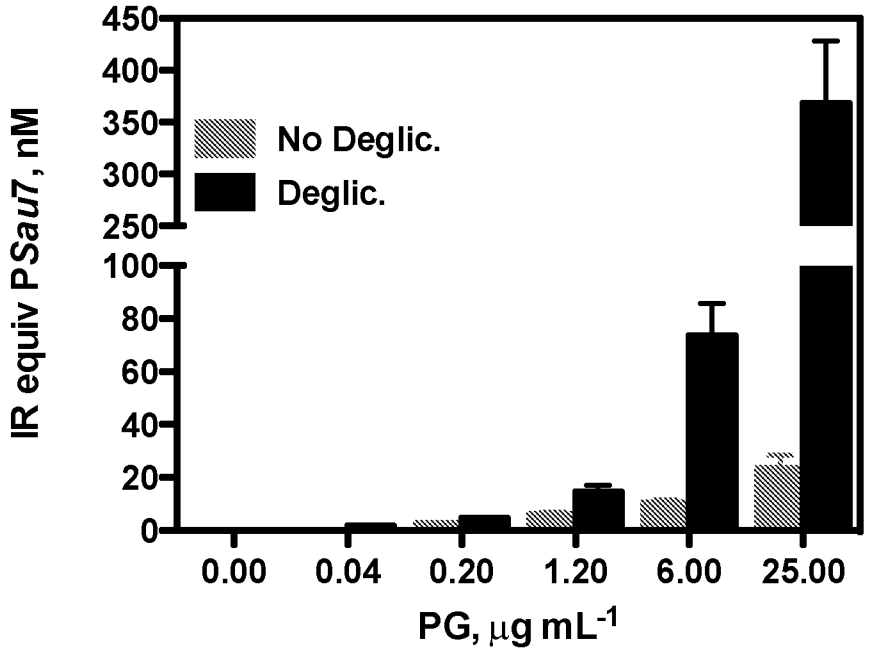

450
400
350
300
250
100
80
60
40
20
0
IR equiv PSau7, nM
No Deglic.
Deglic.
0.00
0.04
0.20
1.20
6.00
25.00
PG, µg mL-1

FIG 4

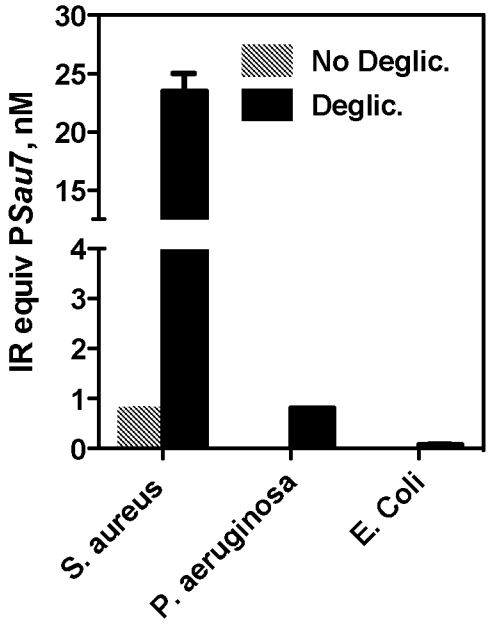

30
25
20
15
4
3
2
1
0
No Deglic.
Deglic.
IR equiv PSau7, nM
S. aureus
P. aeruginosa
E. Coli

FIG 5

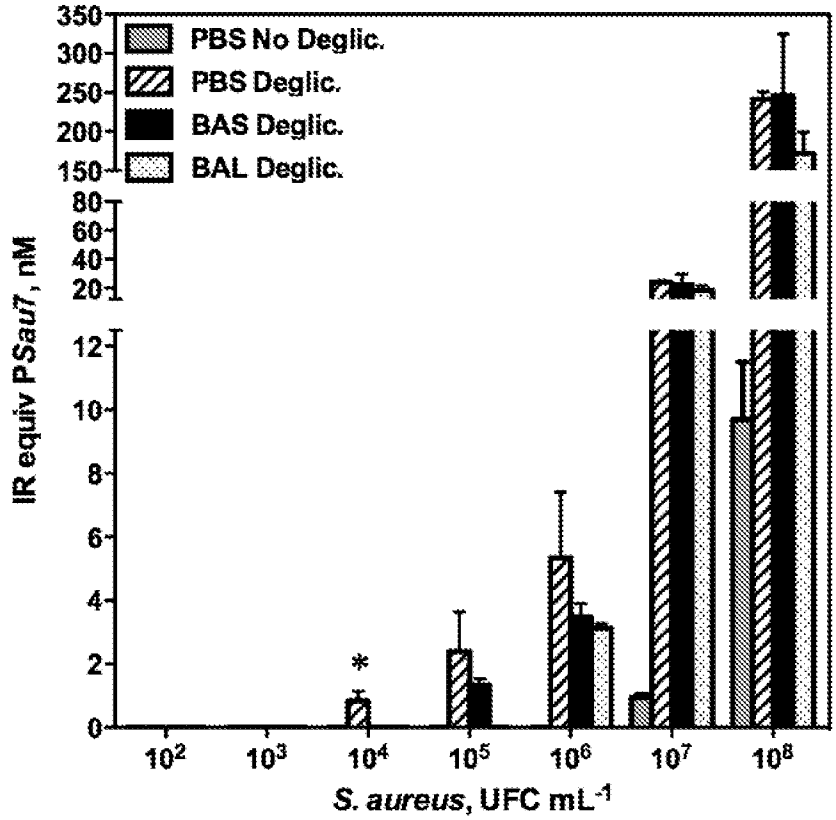

350
300
250
200
150
80
60
40
20
12
10
8
6
4
2
0
PBS No Deglic.
PBS Deglic.
BAS Deglic.
BAL Deglic.
IR equiv PSau7, nM
*
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
10^8
S. aureus, UFC mL^-1

FIG 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS, GOOGLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANDHU, S. et al. "Detection of *Staphylococcus aureus* cell walls by enzyme-linked immunoassay using antibodies prepared from a semi-synthetic peptidoglycan precursor". ANALYST. 2012. Vol. 137, Nº 5, pages 1130-1136, DOI: 10.1039/C2AN16036F, the whole document.	1-35
A	SHARIF, S. et al. "*Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from Carbon-13 spin diffusion". J. AM. CHEM. SOC. 27.05.2009. Vol. 131, Nº 20, pages 7023-7030, DOI: 10.1021/ja808971c, scheme 1.	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18/08/2016	**(23/08/2016)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. Novoa Sanjurjo Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070390

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WERGELAND, H.I. et al. "Antibodies to various bacterial cell wall peptidoglycans in human and rabbit sera". JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 01.03.1987. Vol. 25, Nº 3, pages 540-545, the whole document.	1-35
A	SEIDL, P.H. et al. "The immunochemistry of peptidoglycan". EUR. J. BIOCHEM. 01.04.1977. Vol. 74, Nº 2, pages 353-363, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11400.x, the whole document.	1-35
P,X	PASTELLS, C. et al. "An immunochemical strategy based on peptidoglycan synthetic peptide epitopes to diagnose *Staphylococcus aureus* infections". ANAL. CHIM. ACTA. 19.08.2015. Vol. 889, pages 203-11, DOI: 10.1016/j.aca.2015.07.049, the whole document.	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070390

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K5/027 (2006.01)
C07K14/31 (2006.01)
C07K19/00 (2006.01)
C07K16/12 (2006.01)
G01N33/569 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070390

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SANDHU, S. et al. "Detection of *Staphylococcus aureus* cell walls by enzyme-linked immunoassay using antibodies prepared from a semi-synthetic peptidoglycan precursor". ANALYST. 2012. Vol. 137, Nº 5, páginas 1130-1136, DOI: 10.1039/C2AN16036F, todo el documento.	1-35
A	SHARIF, S. et al. "*Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from Carbon-13 spin diffusion". J. AM. CHEM. SOC. 27.05.2009. Vol. 131, Nº 20, páginas 7023-7030, DOI: 10.1021/ja808971c, esquema 1.	1-35

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18/08/2016	**23 de agosto de 2016 (23/08/2016)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado M. Novoa Sanjurjo Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070390

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WERGELAND, H.I. et al. "Antibodies to various bacterial cell wall peptidoglycans in human and rabbit sera". JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 01.03.1987. Vol. 25, Nº 3, páginas 540-545, todo el documento.	1-35
A	SEIDL, P.H. et al. "The immunochemistry of peptidoglycan". EUR. J. BIOCHEM. 01.04.1977. Vol. 74, Nº 2, páginas 353-363, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11400.x, todo el documento.	1-35
P,X	PASTELLS, C. et al. "An immunochemical strategy based on peptidoglycan synthetic peptide epitopes to diagnose *Staphylococcus aureus* infections". ANAL. CHIM. ACTA. 19.08.2015. Vol. 889, páginas 203-11, DOI: 10.1016/j.aca.2015.07.049, todo el documento.	1-35

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070390

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C07K5/027 (2006.01)
C07K14/31 (2006.01)
C07K19/00 (2006.01)
C07K16/12 (2006.01)
G01N33/569 (2006.01)