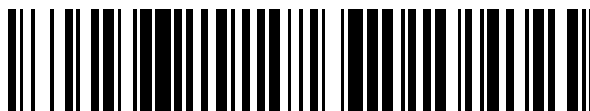


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 719**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009** **E 09734340 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013** **EP 2276499**

54 Título: **Antígeno de gliadina recombinante desamidada**

30 Prioridad:

21.04.2008 US 46693

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

05.09.2013

73 Titular/es:

BIO-RAD LABORATORIES, INC. (100.0%)
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547, US

72 Inventor/es:

WATKINS, MICHAEL, I.;
MARR, GREGORY, A.;
YANG, XIAOYUN;
BRUEHL, RICHARD;
SHAN, DAMING y
COLEMAN, PATRICK, F.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 719 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antígeno de gliadina recombinante desamidada.

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas.

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad respecto de la solicitud de patente U.S. nº. 61/046693, presentada el 21 de abril de 2008.

Antecedentes de la invención

La enfermedad celíaca (CD) es una enfermedad gastrointestinal grave que tiene un componente genético fuerte. La CD se caracteriza por una intolerancia permanente de las proteínas de trigo, cebada, centeno y avena. Aunque no se conoce completamente la fisiopatología de la CD, está claro que la presencia de las proteínas tóxicas en la dieta de los pacientes causa una lesión total o parcial de la mucosa intestinal (Brandtzaeg, P. 1997, Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. Environmental Toxicology and Pharmacology 4; 9-24) que conduce a síndromes de mala absorción causando diarrea, vómitos, dolor abdominal, anorexia, crecimiento retardado, mala nutrición y anemia. La CD se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer intestinal en pacientes no diagnosticados y no tratados (Holmes GKT, 1989, Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten-free diet, Gut 30; 333-338). La CD afecta principalmente a niños menores de tres años, pero es también común en adultos y a veces es clínicamente atípica o asintomática (Ferguson A y otros, 1992, Definitions and diagnostic criteria of latent and potential coeliac disease. Ed. por Auricchio S. Visakorpi J.K., en Epidemiology of CD. Dyn Nutr Res, Basel, Karger 2; 119-127). La CD es más frecuente en pacientes con otra enfermedad genética o autoinmune, como diabetes mellitus insulino dependiente, síndrome de Down, deficiencia selectiva de IgA y dermatitis herpetiformis (Sirgus N y otros, 1993. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweeden. Acta Pediatr 66; 491-494; Zubillaga P y otros, 1993. Down syndrome and coeliac disease. J. Pediatr Gastroenterol Nutr 16: 168-171; Boyce N 1997).

Los síntomas clínicos de CD podrían confundirse con los producidos por otras enfermedades gastrointestinales. En estos casos, la CD es mal diagnosticada y los pacientes no reciben el tratamiento específico, esto es, una eliminación completa de gluten en la dieta. Por otra parte, si un paciente no celíaco es diagnosticado erróneamente como celíaco, tendría una innecesaria dieta exenta de gluten durante toda su vida. Consecuentemente es esencial un diagnóstico preciso de la CD. Actualmente, la norma para el diagnóstico de la CD es la biopsia intestinal, repetida tres veces: a la aparición de los síntomas clínicos, después de varios meses de dieta exenta de gluten y después de un reto con gluten.

A causa de que la biopsia intestinal es un método invasivo y se han desarrollado ensayos serológicos precisos, se ha revisado el criterio anterior (Walker-Smidt y otros, 1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Archiv Dis Child 65:909-911). Actualmente se pueden realizar ensayos serológicos a la aparición de síntomas clínicos y, cuando son positivos, está indicado una biopsia intestinal confirmativa. La respuesta al tratamiento con una dieta exenta de gluten se puede seguir por ensayos serológicos. Si hay discrepancias entre la respuesta clínica al tratamiento y el resultado de los ensayos serológicos, estaría indicada una segunda biopsia intestinal. Se han desarrollado varios ensayos serológicos para la diagnosis de la enfermedad celíaca, como la detección de anticuerpos para antígenos celulares, o anticuerpos para antígenos de alimentos, como las gliadinas. Hay kits diagnósticos para la detección de: anticuerpos endomisiales, anticuerpos antirreticulina, anticuerpos antigliadina y anticuerpos transglutaminasa antitejido.

Los anticuerpos antigliadina (AGA) se han usado extensamente para el diagnóstico serológico de CD (Stern M y otros, Validation and standardization of serological screening tests for coeliac disease in 1996. 3rd EMRC/ESPGAN Workshop, 1996, 5-8 dic., 1996, Molsheim, Francia, págs. 9-24; Catassi C y otros, 1999, Quantitative antigliadin ttbody measurements in clinical practice; an italian multicenter study. Ital J Gastroenterol Hepatol 31; 366-370). Los AGA se detectan principalmente por ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima), método más simple, más objetivo que IFA (análisis de anticuerpos inmunofluorescente indirecto), y se puede usar para el análisis de un gran número de muestras. Sin embargo, los AGA son menos específico para CD que los anticuerpos endomisiales (EMA) y la detección de anticuerpos para isotipos de IgA o IgG requiere dos ensayos independientes. Recientemente se ha dado cuenta de un inmunoensayo visual para la detección de AGA que resuelve algunos de estos problemas (Garrote JA, Sorell L, Alfonso P y otros 1999. A simple visual immunoassay for the screening of coeliac disease. Eur. J Clin Invest 29; 697-699; Oficina Española de Patentes y Marcas nº. 9801067).

En 1997, Districh y otros identificaron transglutaminasa de tejido (tTG), una proteína de 85 kDa, como el principal autoantígeno detectado por anticuerps antiendomisiales (Dietrich W y otros 1997. Identification of tissue transaminase as the autoantigen of coeliac disease. Nat Med 3:797-801). Se ha dado cuenta últimamente de la detección de anticuerpos anti-tTG en formatos ELISA o radioligando (RLA) basados en tTG de extractos de hígado de cobaya o tTG humana recombinante clonados de diferentes tejidos (Sulkanen S y otros 1998. Tissue transglutaminase

antiantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. Gastroenterology 115:1322-1328; Siessler J. y otros, 1999. Antibodies to human recombinant tissue transaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. Horm Metab Res 31; 375-379).

Los procedimientos de la técnica anterior para la detección de la enfermedad celíaca usan epitopos de gliadina o piezas de la proteína de gliadina en un ensayo que condujo a negativos falsos y positivos falsos. Lo que se necesita es un ensayo que proporcione nuevos antígenos que contienen un conjunto de epitopos más inclusivo que proporcione un ensayo más preciso para la enfermedad celíaca. Sorprendentemente, la presente invención satisface ésta y otras necesidades.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto sufre la enfermedad celíaca poniendo en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con un antígeno formado a partir de una proteína de fusión de gliadina inmovilizada sobre un soporte sólido. La proteína de fusión del antígeno incluye una gliadina recombinante desamidada unida a una etiqueta tal como proteína de glutatióna-S-transferasa (GST). El antígeno se prepara por inmovilización sobre el soporte sólido de la proteína de fusión de gliadina por la vía de la etiqueta. El antígeno puede incluir además transglutaminasa tisular (tTG) unida por cruce a la proteína de fusión de gliadina. Cuando está presente tTG, la tTG y la gliadina recombinante desamidada se mezclan antes de la inmovilización sobre la fase sólida.

El estado actual de los procedimientos de la técnica para detectar la enfermedad celíaca se utiliza gliadina recombinante y natural, péptidos de gliadina, péptidos de gliadina desaminada o transglutaminasa de tejido como antígenos para la detección de los correspondientes anticuerpos. Se ha sugerido que la gliadina desamidada, tTG y un complejo de gliadina desamidada y tTG son los antígenos del estado de la enfermedad que son presentados por células T para la generación de anticuerpos. Se sabe que la presencia de anticuerpos para la gliadina natural no es una enfermedad específica, lo que es puesto en evidencia por la presencia de anticuerpos de IgG antigliadina muy prevalentes en pacientes sanos. La gliadina no es una proteína homogénea sino, más bien, una clase de proteínas cuyas secuencias varían según las especies (trigo, centeno y cebada) y la cepa, e incluso dentro de una cepa. Como resultado, los ensayos corrientes o no poseen un repertorio de epitopos completo (por ejemplo, péptidos de gliadina desamidada sintéticos o recombinantes) o generan resultados positivos falsos cuando se usa el antígeno recombinante desamidado. La presente invención se dirige a las deficiencias de los procedimientos de la técnica anterior por combinación de una proteína de gliadina recombinante desamidada con una etiqueta inmovilizada sobre un soporte sólido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca, antígeno que incluye una gliadina recombinante desamidada unida a una etiqueta formando una proteína de fusión de gliadina. La etiqueta está inmovilizada sobre un soporte sólido.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca preparado por el procedimiento de poner en contacto un soporte sólido con una proteína de fusión de gliadina, proteína de fusión de gliadina que incluye una gliadina recombinante desamidada unida a una etiqueta, de manera que la proteína de fusión de gliadina está inmovilizada sobre el soporte sólido mediante la etiqueta. El antígeno para detectar la enfermedad celíaca se prepara de esta manera.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto sufre enfermedad celíaca poniendo en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con el antígeno descrito antes; y detectando cualquier anticuerpo que se haya unido específicamente al antígeno como indicación de la presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.

En un quinto asunto, la presente invención proporciona un kit que incluye un antígeno descrito antes, un reactivo de detección y opcionalmente como mínimo uno de tampones, sales, estabilizadores e instrucciones.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado de la SEC ID N:5.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra al trimer de D2 de gliadina recombinante desamidada de la presente invención que tiene una relación señal a ruido mejorada en comparación con el monómero de D2 de gliadina recombinante desamidada (NBD2).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Tal como se usa en la presente solicitud, el término "poner en contacto" se refiere al proceso de poner en contacto al menos dos especies distintas de manera que puedan reaccionar. El producto de reacción resultante se produce directamente por reacción entre los reactivos añadidos o de los intermedios de uno o varios de los reactivos

añadidos que se puede producir en la mezcla de reacción.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “fluido corporal” se refiere a fluidos de un mamífero, incluidos no limitativamente, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, leche de pecho, fluido intersticial, linfa, moco, fluido pleural, pus, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, fluido cerebroespinal, fluido sinovial o fluido intracelular. Un experto en la técnica apreciará que otros fluidos corporales son útiles en la presente invención.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “reticulador” se refiere a un resto biológico bifuncional o multifuncional que es capaz de unir juntas dos mitades separadas. Se describen más adelante ejemplos de reticuladores útiles en la presente invención.

Tal como se usa en la presente solicitud, “anticuerpo” incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. El término incluye también formas genéticamente diseñadas tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos de murino humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos bisespecíficos). El término “anticuerpo” incluye también formas de unión de antígeno de anticuerpos, incluidos fragmentos con capacidad de unir antígenos (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG. Véase también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kubly, J. Immunology, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998). El término se refiere también a fragmentos Fv recombinantes de cadena corta (scFv). El término anticuerpo incluye también moléculas bivalentes o bisespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y bisespecíficas en, por ejemplo, Kostelny y otros (1992), J. Immunology 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger y otros, 1993, supra, Gruber y otros (1994) J Immunology:5368, Zhu y otros (1997) Protein Sci. 6:781, Hu y otros (1996) Cancer Res. 56: 3055, Adams y otros (1993) Cancer Res. 53: 4026, y McCartney y otros (1995) Protein Eng. 8:301.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular se puede generar por procedimientos recombinantes tales como selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores fago o similares, véase por ejemplo Huse y otros Science 246: 1275-1281 (1989); Ward y otros, Nature 341: 544-546 (1989), y Vaughan y otros, Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o inmunizando un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.

Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones son conocidas también como “dominios”). Las regiones variables de cadenas pesada y ligera contienen cuatro regiones “marco” interrumpidas por tres regiones hipervariables, denominadas también “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. La extensión de las regiones marco y CDR ha sido definida. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras y pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, que es la combinación de regiones marco de las cadenas ligeras y pesadas constitutivas, sirve para situar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son responsables principalmente de unirse a un epitopo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se refieren típicamente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del término N, y se identifican así típicamente por la cadena en la que está situada la CDR particular. Así, una V_H CDR3 está situada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra.

Las referencias a “V_H” o un “VH” se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluida la cadena pesada de un Fv, scFv o Fab. Las referencias a “V_L” o “VL” se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluida la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

La expresión “Fv de cadena individual” o “scFv” se refiere a un anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional de dos cadenas se han unido formando una cadena. Típicamente, entre las dos cadenas se inserta un péptido conector para posibilitar un plegado satisfactorio y la creación de un sitio de unión activo.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante, o una porción de ella, es alterada, reemplazada o intercambiada de manera que el sitio de unión del antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase diferente o alterada, función ejecutora y/o especie, o una molécula enteramente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, un factor de crecimiento, un fármaco, etc; o (b) la región variable, o porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad al antígeno diferente o alterada.

Un “anticuerpo humanizado” es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor están reemplazados por restos de CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como un ratón, una rata o un conejo que tiene la

especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana están reemplazados por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor ni en las secuencias importadas de CDR o marco. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y, típicamente dos, de los dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de CDR corresponde a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones marco (FR) es la de una secuencia consensual de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones y otros, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y otros, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven y otros, Science 239: 1534-1536 (1988)), por sustitución por CDR o secuencias de CDR de roedor las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Consecuentemente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente U.S. nº. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

“Epitopo” o “determinante antígeno” se refiere a un sitio de un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epitopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegado terciario de una proteína. Los epitopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente son retenidos al exponerlos a disolventes desnaturalizantes. Un epitopo típicamente incluye al menos 3 y, más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Entre los procedimientos para determinar la conformación espacial de epitopos figuran, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “sujeto” se refiere a animales tales como mamíferos, incluidos, no exclusivamente, primates (por ejemplo seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas ratones y similares.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “inmovilizado” se refiere a la asociación de la tTG, la proteína de fusión de gliadina o el complejo de la proteína de fusión tTG-gliadina con un material soporte sólido por formación de una unión covalente, unión por hidrógeno, interacción dipolo-dipolo o mediante interacciones de Van der Waals. La inmovilización puede ser temporal o permanente.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “antígeno” se refiere a una molécula que es capaz de estimular una respuesta inmune tal como por producción de anticuerpos. Entre los antígenos de la presente invención figuran proteína de fusión de gliadina inmovilizada en soporte sólido y complejo de proteína de fusión tTH-gliadina inmovilizada en soporte sólido. La proteína de fusión de gliadina de la presente invención puede incluir una gliadina recombinante desamidada y una etiqueta, tal como proteína de glutatona S-transferasa.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “tampones” se refiere a cualquier ácido o base orgánico o inorgánico que resiste cambios del pH y mantiene el pH en torno al punto deseado. Entre los agentes tampón de la presente invención figuran, no limitativamente, hidróxido sódico, fosfato sódico dibásico anhidro y mezclas de los mismos. Un experto en la técnica apreciará que en la presente invención son útiles otros agentes tampón.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “transglutaminasa tisular (tTG)” se refiere a una enzima de la familia de la transglutaminasa que retícula proteínas entre un grupo amino de un resto de lisina y un grupo carboxamida de un resto de glutamina. Esto crea un enlace intermolecular o intramolecular. La tTG se puede usar para detectar la enfermedad celíaca.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “proteína de fusión de gliadina” se refiere a una proteína de gliadina unida a una etiqueta tal como glutatona S-transferasa (GST). La proteína de gliadina incluye una proteína de gliadina recombinante o una proteína de gliadina sintética, entre otras. Típicamente, las etiquetas son otras proteínas o compuestos que se pueden usar como etiquetas de afinidad para purificación, para solubilización, cromatografía, como etiquetas de epitopos, etiquetas de fluorescencia y otras. Entre las etiquetas útiles en la presente invención figuran, no limitativamente, BCCP, etiqueta c-myc, etiqueta de calmadulina, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta His, etiqueta de proteína que une maltosa, etiqueta Nus, etiqueta de glutatona S-transferasa, etiqueta de proteína fluorescente verde, etiqueta de tioredoxina, etiqueta S, Spretag II, etiqueta HA, Softag 1, Softag 3, etiqueta T7, péptidos del tipo de elastina, dominio de unión de quitina y Xilanas 10A. Un experto en la técnica apreciará que otras proteínas son útiles en las proteínas de fusión de la presente invención.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “complejo de tTG-proteína de fusión de gliadina” se refiere a un complejo formado cuando la tTG y la proteína de fusión de gliadina se unen juntas. La tTG y la proteína de fusión de gliadina pueden unirse de varias formas, mediante una variedad de reacciones. La tTG se puede unir a una o ambas de la etiqueta y la gliadina recombinante desamidada de la proteína de fusión de gliadina.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “gliadina recombinante desamidada” se refiere a una proteína de gliadina desamidada preparada por ingeniería genética. Son proteínas desamidadas las que han tenido algunos o la totalidad de los grupos funcionales amida libres hidrolizados a ácidos carboxílicos, tales la conversión de glutaminas a ácido glutámico. Las gliadinas recombinantes desamidadas útiles en la presente invención tienen como mínimo una identidad de secuencia del 75% con la SEC ID NO.1 o SEC ID NO:2.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “reticulado” se refiere a la formación de más de un enlace entre dos diferentes restos químicos. En la presente invención, los restos químicos pueden ser especies biológicas tales como proteínas, enzimas, anticuerpos, etc., o materiales soporte sólidos. La funcionalidad química que une los restos químicos individuales que se reticulan se denomina “reticulador”. Un reticulador típicamente es un compuesto bifuncional que reacciona con un grupo funcional reactivo de un resto químico y un grupo funcional reactivo de otro resto químico, uniendo así entre sí ambos restos químicos. Los reticuladores pueden ser reticuladores homobifuncionales o reticuladores heterobifuncionales. Son reticuladores homobifuncionales aquellos en los que los grupos funcionales del reticulador homofuncional que reaccionan con cada resto químico son los mismos. Son reticuladores heterobifuncionales aquellos en los que los grupos funcionales del reticulador heterobifuncional que reaccionan con cada resto químico son diferentes. Se describen más detalladamente más adelante reticulares homobifuncionales y heterobifuncionales preferidos de la presente invención.

Tal como se usa en la presente solicitud, los términos “idénticos” o “identidad porcentual”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácido o nucleótidos que son los mismos (esto es, 60% de identidad, preferiblemente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en una región especificada), cuando se comparan y alinean para lograr una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Tales secuencias se dice entonces que son “sustancialmente idénticas”. Esta definición se refiere también al cumplimiento de una secuencia de ensayo.

La expresión “sustancialmente idéntico”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a una secuencia o subsecuencia que tiene como mínimo una identidad de secuencia de 40% con una secuencia de referencia. Alternativamente, el porcentaje de identidad puede ser cualquier número entero de 40% a 100%. Las realizaciones más preferidas incluyen como mínimo 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en comparación con una secuencia de referencia usando los programas descritos en la presente solicitud, preferiblemente BLAST, usando parámetros estándar como se describe más adelante.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, si es necesario se designan coordenadas de subsecuencia y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar parámetros de programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego las identidades de secuencia porcentuales para las secuencias de ensayo en relación a la secuencia de referencia sobre la base de los parámetros del programa. Para la comparación de secuencia de ácidos nucleicos y proteínas, se usan los algoritmos de BLAST y BLAST 2.0 y los parámetros por defecto que se discuten seguidamente.

Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad porcentual y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, descritos por Altschul y otros, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990), respectivamente. Se usan BLAST y BLAST 2.0 con los parámetros descritos en la presente solicitud para determinar la identidad de secuencia porcentual para ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar los análisis BLAST es asequible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este algoritmo implica identificar primeramente pares de secuencia de alta puntuación (HSP) por identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia cuestionada, que casan con o satisfacen una puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se señala como el umbral de puntuación de palabra de vecindad (Altschul y otros, supra). Estas dianas de palabra de vecindad inicial actúan como semilla para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Las dianas de palabras se extienden en ambas direcciones junto con cada secuencia en tanto que se puede aumentar la puntuación acumulativa de alineamiento. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótido, los parámetros M (puntuación premio para un par de restos que casan, siempre >0) y N (puntuación de castigo para restos que no casan, siempre <0). Para secuencias de aminoácido, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las dianas de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X de su máximo alcanzado; la puntuación acumulativa baja a cero o menos debido a la acumulación de uno o varios alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótido) usa como defectos una longitud de palabras (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de

aminoácido, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación de BLOSUM62” (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915 (1989)) alineamientos de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma mínima ($P(N')$) que proporciona una indicación de la probabilidad de que por casualidad se produzca un casamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma mínima en comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y, muy preferiblemente, menor que aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo por cruce con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren sólo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones de estricta. Otra indicación más es de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se puedan usar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

Tal como se usa en la presente solicitud, los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan sinónimamente y se refieren a un polímero de cadena simple o doble o bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido con lectura del extremo 5' al 3'. Generalmente, un ácido nucleico de la presente invención contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos pueden usarse análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternos, que comprenden, por ejemplo, uniones fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press); y esqueletos y uniones de ácido nucleico de péptido. Entre otros ácidos nucleicos análogos figuran aquellos con esqueletos positivos, esqueletos no iónicos, y esqueletos no-ribosa. Así, los ácidos nucleicos o polinucleótidos pueden incluir también nucleótidos modificados que permiten una lectura correcta por una polimerasa. “Secuencia de polinucleótido” o “secuencia de ácido nucleico” incluye ambas cadenas, sentido y antisentido, de un ácido nucleico, como cadenas simples individuales o en una duplex. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, la representación de una cadena individual también define la secuencia de la cadena complementaria; así, las secuencias aquí descritas también proporcionan el complemento de la secuencia. A no ser que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico descrita aquí también abarca implícitamente sus variantes (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. El ácido nucleico puede ser ADN, ambos genómicos y ADNc, ARN o un híbrido, pudiendo contener el ácido nucleico combinaciones desoxirribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases, incluidos uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

Tal como se usa en la presente solicitud, la frase “una secuencia de ácido nucleico que codifica” se refiere a un ácido nucleico que contiene información de secuencia para un ARN estructural tal como ANRr, ARNt, o una secuencia principal de aminoácido de una proteína o péptido específico, o un sitio de unión para un agente regulador transactuante. La frase abarca específicamente codones degenerados (esto es, diferentes codones que codifican un aminoácido individual) de la secuencia o secuencias nativa(s) que se pueden introducir para conformarse con preferencia de codón en una célula hospedadora específica.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “unido específicamente” se refiere a la captura o atrapamiento del antígeno de la presente invención por un anticuerpo que es indicador de la presencia de enfermedad celíaca.

II. Antígeno

La presente invención proporciona un antígeno y un procedimiento para detectar la enfermedad celíaca. El antígeno incluye una proteína de fusión de gliadina inmovilizada sobre un material soporte sólido. La proteína de fusión de gliadina incluye una gliadina recombinante desamidada y una etiqueta. El antígeno puede incluir opcionalmente transaminasa tisular (tTG). Cuando está presente, la proteína de fusión de gliadina y la tTG pueden estar unidas por covalencia antes de la inmovilización sobre el soporte sólido, como puede ser por transamidación formando un complejo de proteína de fusión de gliadina-tTG. Después de la inmovilización del complejo de proteína de fusión de gliadina-tTG sobre el soporte sólido, la proteína de fusión de gliadina y la tTG se pueden reticular usando reticuladores adecuados.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca. El antígeno de la presente invención incluye la proteína de fusión de gliadina unida a un soporte sólido descrita más adelante.

A. Proteína de fusión de gliadina

La proteína de fusión de gliadina útil en la presente invención incluye una gliadina recombinante desamidada y una etiqueta. Un experto en la técnica reconocerá que muchas proteínas de gliadina recombinante son útiles en el procedimiento de la presente invención. En algunas realizaciones, la proteína de gliadina recombinante puede incluir D2 (Aleanzi y otros, Clin Chem 2001, 47 (11), 2023), secuencia peptídica: QPEQPQSFPEQERPF (SEC ID NO:1). La proteína de gliadina recombinante también puede incluir variantes de D2 representadas por la siguiente fórmula:



en la que cada X es glutamina (Q) o ácido glutámico (E) de manera que al menos un X es glutamina y al menos un X es ácido glutámico (SEC ID NO:6). La proteína de gliadina recombinante de la presente invención puede ser también un dímero o trímero de D2 o sus variantes, separados por cualquier espaciador adecuado, tal como GGGGS (SEC ID NO:7). Un experto en la técnica apreciará que otros espaciadores son útiles en la presente invención.

En algunas realizaciones, la gliadina recombinante desamidada es un dímero de D2. En otras realizaciones, la proteína recombinante desamidada es un trímero de D2 (SEC ID NO:2). En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona cualquier secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido en la SEC ID NO: o SEC ID NO:2. Las proteínas de gliadina recombinante desamidada de la presente invención se unen a anticuerpos de gliadina anti-desamidada y son por ello capaces de identificar sujetos que sufren trastornos relacionados con el gluten, tales como la enfermedad celíaca. Un experto en la técnica apreciará que otras proteínas de gliadina recombinante desamidada son útiles en la presente invención.

La proteína de fusión de gliadina también incluye una etiqueta. Cualquier etiqueta conocida en la técnica es útil en las proteínas de fusión de gliadina de la presente invención. Entre las etiquetas adecuadas en el antígeno de la presente invención figuran, no limitativamente, glutatión S-transferasa (GST), His-tag, FLAG, Streptag II, HA-tag, Softag 1, Softag 3, c-myc, T7-tag, S-tag, péptidos del tipo elastina, dominio que une quitina, tioredoxina, Xylanase 10A, proteína que se une a maltosa y NusA. En algunas realizaciones, la etiqueta es GST o His-tag. Un experto en la técnica apreciará que otras etiquetas son útiles en la presente invención.

En otra realización, la etiqueta es una proteína de Glutathione S-transferasa (GST). La proteína de GST (SEC ID NO:3) desempeña muchas funciones, posibilitando entre ellas la purificación de la proteína de gliadina recombinante y la presentación de epitopos representados en la proteína de gliadina recombinante.

Cuando la proteína de fusión de gliadina incluye GST y la gliadina recombinante desamidada es el trímero de D2, la proteína de fusión de gliadina está representada por la SEC ID NO:4. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona cualquier secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido en la SEC ID NO:4. La proteína de fusión de gliadina de la presente invención puede prepararse por una variedad de procedimientos, incluidos procedimientos recombinantes tales como los descritos.

La inmovilización de la proteína de fusión de gliadina sobre el soporte sólido se puede realizar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. La inmovilización de la proteína de fusión de gliadina en el soporte sólido puede ser debida a covalencia o formación de unión iónica, unión por hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, así como a interacciones de anticuerpo-antígeno. Un experto en la técnica apreciará que otros procedimientos de inmovilización son útiles en la presente invención.

En algunas realizaciones, el antígeno incluye también transglutaminasa tisular (tTG). Cuando está presente la tTG, la tTG y la proteína de fusión de gliadina forman un complejo de tTG-proteína de fusión de gliadina. La tTG y la proteína de fusión de gliadina se pueden unir de varias maneras, tales como la formación de enlaces covalentes, enlaces iónicos, unión por puente de hidrógeno o por interacciones de Van der Waals. Cuando la tTG y la proteína de fusión de gliadina están unidas por covalencia, los enlaces covalentes se pueden formar por varias reacciones, tales como transamidación. La transamidación puede tener lugar en diversas condiciones, tales como en presencia de Ca^{2+} . La tTG puede unirse a la etiqueta o a la gliadina recombinante desamidada de la proteína de fusión de gliadina, o a ambas. La tTG se inmoviliza en el soporte sólido en las mismas condiciones y al mismo tiempo en que se inmoviliza la proteína de fusión de gliadina. Un experto en la técnica conoce la transaminasa tisular, que ha sido previamente descrita; véase NCBI RefSeq NP_004604 y NP_945189 (13 de abril, 2008).

En otras realizaciones, la tTG y la proteína de fusión de gliadina están unidas covalentemente por un reticulador. Un experto en la técnica apreciará que hay disponibles otros procedimientos de reticulación, tales como mediante unión iónica, por puente hidrógeno o por fuerzas de Van der Waals. Un experto en la técnica reconocerá que cualquier reticulador es adecuado en la presente invención. En algunas realizaciones, el reticulador es un miembro seleccionado entre el grupo constituido por un reticulador heterobifuncional y un reticulador homobifuncional. En otras realizaciones, el reticulador es un reticulador homobifuncional. En otras realizaciones más, el reticulador es un reticulador seleccionado entre el grupo constituido por bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3), bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS), bis[sulfosuccinimidilsuccinato] de etilenglicol (sulfo-EGS), bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES), ditiobis(succinimidil)propionato (DSP), 3,3'-ditiobis-

(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), suberato de disuccinimidilo (DSS), glutarato de disuccinimidilo (DSG), N-succinimidiladipato de metilo, (MSA), tartrato de disuccinimidilo (DST), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono (DFDNB), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC o EDAC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), hidroxilamina y sulfo-LC-SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridil)ditio)propionato y sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato (sulfo-LC-SPDP). En otra realización, el reticulador es bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3).

En otra realización, la gliadina recombinante desamidada tiene una identidad del 95% con la SEC ID NO:2. Un experto en la técnica apreciará que son posibles otras identidades, tales como identidad de 60%, preferiblemente de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en una región especificada cuando se compara y alinea para máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada. Se dice luego que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". La gliadina recombinante desamidada de la presente invención que tiene alguna identidad porcentual con la SEC ID NO: 2 se puede unir a anticuerpos anti-gliadina en una muestra con el fin de detectar la enfermedad celíaca. En algunas otras realizaciones, la gliadina recombinante desamidada tiene la SEC ID NO: 2.

B. Soporte sólido

Un material soporte sólido para uso en la presente invención se caracteriza por las propiedades siguientes: (1) insolubilidad en fases líquidas usadas para exploración; (2) capacidad de movilizarse en tres dimensiones independientes de todos los otros soportes; (3) que contenga muchas copias de la proteína de fusión de gliadina o complejo de proteína de fusión de la tTG-gliadina; (4) compatibilidad con las condiciones del ensayo de exploración; y (5) ser inerte a las condiciones del ensayo. También, un soporte preferido tiene grupos funcionales reactivos, incluidos, no limitativamente, hidroxilo, carboxilo, amino, tiol, aldehído, halógeno, nitro, ciano, amido urea, carbonato, carbamato, isocianato, sulfona, sulfonato, sulfonamida, sulfoxido, etc. para unir la proteína de fusión de gliadina y tTG.

Tal como se usa en la presente solicitud, el material soporte sólido no está limitado a un tipo específico de soporte. Hay disponibles un gran número de soportes que son conocidos por un experto en la técnica. Entre los soportes de fase sólida figuran geles de sílice, resinas, películas plásticas derivatizadas, perlas tales como perlas de vidrio o plástico, algodón, geles de alúmina, polisacáridos tales como Sepharose y similares, etc. Otros soportes sólidos pueden ser placas de microtitulación de ELISA. Un soporte de fase sólida adecuado se puede seleccionar sobre la base del uso final deseado y la adecuación para varios protocolos de síntesis. Por ejemplo, en la síntesis de poliamidas pueden ser soportes de fase sólida útiles resinas tales como poliestireno (por ejemplo la resina PAM obtenida de Bachem Inc., Península Laboratories, etc.), resina POLYHIPE^{MC} (obtenida de Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenida de Península Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGel^{MC}, Rapp Polymere, Tübingen, Alemania), resina de polidimetil-acrilamida (asequible de Milligen/Bioserch, California), o perlas de PEGA (obtenidas de Polymer Laboratories). Seguidamente se describen soportes de síntesis de fase sólida para síntesis específica. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una perla. Un experto en la técnica reconocerá que en la presente invención son útiles muchos tipos de soportes sólidos.

C. Procedimiento para preparar antígeno de gliadina recombinante desamidada.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca preparado por un procedimiento que incluye poner en contacto un soporte sólido con una proteína de fusión de gliadina que tiene una gliadina recombinante desamidada unida covalentemente a una etiqueta formando un soporte sólido modificado en el que la proteína de fusión de gliadina está inmovilizada sobre el soporte sólido modificado mediante la etiqueta. Así se prepara el antígeno para detectar la enfermedad celíaca.

La etiqueta se ha descrito antes. En algunas realizaciones, el antígeno es GST o un His-tag. En otra realización, la etiqueta es GST.

Cuando está presente tTG, el procedimiento puede incluir también la formación de un enlace covalente entre la proteína de fusión de gliadina y la tTG antes de la etapa de contacto para formar un complejo de proteína de fusión de tTG-gliadina. El proceso de formación de un enlace covalente entre la proteína de fusión de gliadina y la tTG puede tener lugar también durante y/o después de la etapa de poner en contacto. La formación del complejo de la proteína de fusión de gliadina y la tTG puede realizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el complejamiento tiene lugar por transamidación para formar un enlace covalente.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende además poner en contacto el soporte sólido modificado con un reticulador para reticular la proteína de fusión de gliadina y la tTG. En algunas otras realizaciones, el reticulador reticula la proteína de fusión GST con tTG. Un experto en la técnica apreciará que cualquier reticulador tal como los descritos antes es útil en el procedimiento de la presente invención. La reticulación puede tener lugar mediante unión por hidrógeno o formación de enlace iónico.

1, Procedimientos recombinantes generales

La presente invención puede emplear técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante para la preparación de polipéptidos de gliadina recombinante desamidada. Entre los textos básicos que consideran los procedimientos generales para uso en esta invención figuran Sambrook & Russell, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer Expression, A Laboratory Manual* (1990), y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y otros, eds., 1994-1999).

Una gliadina recombinante desamidada, o una proteína de fusión, por ejemplo, que comprende gliadina recombinante desamidada y GST, se puede expresar usando métodos bien conocidos en la técnica. Se pueden usar células hospedadoras eucarióticas y procarióticas tales como células animales, células de insecto, bacterias, hongos y levaduras. Los métodos para uso de células hospedadoras en la expresión de ácido nucleicos aislados son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en la referencia general, supra. Consecuentemente, esta invención proporciona también células hospedadoras y vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente solicitud.

Los ácidos nucleicos que codifican una gliadina recombinante desamidada o una proteína de fusión se pueden hacer usando técnicas recombinantes o sintéticas estándar. Los ácidos nucleicos pueden ser ARN, ADN o híbridos de los mismos. Un experto en la técnica puede construir una variedad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que codifican el mismo polipéptido. Las metodologías de clonación para realizar estas tareas y los métodos de secuenciación para verificar la secuencia de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se sintetizan in vitro. Los desoxinucleótidos se pueden sintetizar químicamente de acuerdo con el procedimiento en fase sólida de triéster de fosoramidita descrito por Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado, por ejemplo, como se describe por Needham-VanDevanter y otros, *Nucleic Acids Res.* 12:615.9-6168 (1984). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que codifica la proteína deseada se pueden obtener por una reacción de amplificación, por ejemplo, RCP.

Un experto reconocerá muchas otras maneras de generar alteraciones o variantes de una secuencia de polipéptido dada. Muy comúnmente, las secuencias de polipéptido se alteran cambiando la correspondiente secuencia de ácido nucleico y expresando el polipéptido.

Un experto puede seleccionar un ácido nucleico o polipéptido deseado de la invención sobre la base de las secuencias a las que se ha hecho referencia en la presente solicitud y el conocimiento fácilmente disponible en la técnica en cuanto a la estructura y la función de gliadina recombinante desamidada. Las características físicas y las propiedades generales de estas proteínas son conocidas por quienes trabajan en este campo.

Para obtener una expresión de alto nivel de una gliadina recombinante desamidada, gliadina recombinante desamidada-proteína de fusión GST, se construye un vector de expresión que incluye elementos tales como un promotor para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción, un sitio de unión de ribosoma para iniciación translacional, y similares. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las referencias que proporcionan procedimientos de expresión de clonación y protocolos citados aquí antes. Los sistemas de expresión de bacterias para expresar ribonucleasa son asequibles en, por ejemplo, *E. Coli Bacillus sp.*, and *Salmonella* (véase también Palva y otros, *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach y otros, *Nature* 302:543-545 (1983). Hay disponibles comercialmente kits para tales sistemas de expresión. Los sistemas de expresión eucarióticos para células mamíferas, levadura y células de insectos son bien conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente.

Además del promotor, el vector de expresión típicamente contiene una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para expresión del ácido nucleico en células hospedadoras.

Una casete típica de expresión contiene así un promotor operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico que codifica la gliadina recombinante desamidada, gliadina recombinante desamidada-proteína de fusión GST y señales requeridas para una poliadenilación eficiente del transcripto, sitios de unión de ribosoma y terminación de la traducción. Dependiendo del sistema de expresión, la secuencia de ácido nucleico que codifica la gliadina recombinante desamidada, gliadina recombinante desamidada, proteína de fusión GST, puede unirse a una secuencia de péptido señal escindible promoviendo la secreción de la proteína codificada por la célula transformada.

Como se ha señalado antes, la casete de expresión debe contener también una región de terminación de la transcripción corriente abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de terminación se puede obtener a partir del mismo gen que la secuencia de promotor o se puede obtener de diferentes genes.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética a las células no es particularmente crítico. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para expresión en células eucarióticas o

procarióticas. Entre los vectores estándar de expresión bacteriana figuran plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET15b, pET32D, pET-22b(+) y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. También se pueden añadir etiquetas de epitopo a proteínas recombinantes para obtener métodos de aislamiento convenientes, por ejemplo, 6-his. Estos vectores comprenden además de la casete de expresión que contiene la secuencia de codificación, el promotor T7, iniciador y terminador de transcripción, el sitio de origen pBR322, una secuencia de codificación bla y un operador lacI.

Los vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico que codifican moléculas de ARN o las proteínas de fusión pueden expresarse en una variedad de células hospedadoras, incluidas *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levadura y diversas células eucarióticas tales como COS, CHO y líneas de células HeLa y líneas de células de mieloma. Además de en células, los vectores pueden expresarse por animales transgénicos, preferiblemente ovejas, cabras y reses. Típicamente, en este sistema de expresión, la proteína recombinante se expresa en la leche del animal transgénico.

Los vectores de expresión o plásmidos de la invención se pueden transferir a la célula hospedadora escogida por métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro cálcico para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico, fusión liposomal o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por su resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como genes amp, gpt, neo y hyg.

Una vez expresada, la proteína expresada se puede purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluidas precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna (incluida cromatografía de afinidad), electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, N.Y. (1990); Deutscher, Methods in Enzymology, vol. 182; Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sambrook y Ausubel, ambos supra).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que incluye la SEC ID NO:5, que codifica la secuencia del trómero de D2 de proteína de gliadina recombinante. En otras realizaciones, el ácido nucleico aislado es un vector de expresión. En algunas otras realizaciones, el vector de expresión está en una célula hospedadora.

2. Inmovilización sobre el soporte sólido

La proteína de fusión de la presente invención se puede inmovilizar a cualquier material soporte sólido útil por cualquier método de inmovilización útil conocido en la técnica. La inmovilización de la proteína de fusión de gliadina al soporte sólido puede ser por covalencia o por formación de enlace iónico, unión por hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, así como por interacciones anticuerpo-antígeno. Un experto en la técnica apreciará que en la presente invención son útiles otros métodos de inmovilización.

Se han desarrollado otros compuestos que permiten la inmovilización de manera similar a anticuerpos. Ciertos de estos compuestos "anticuerpos mímicos" usan andamios de proteína no inmunoglobulínica como marcos de proteína alternativos para las regiones variables de anticuerpos.

Por ejemplo, Ladner y otros (patente U.S. n.º 5.260.203) describen moléculas que se unen a cadenas de polipéptido individual con una especificidad de unión similar a la de la región variable agregada, pero molecularmente separada, de cadena ligera y pesada. La molécula de unión de cadena individual contiene los sitios de unión de antígeno de ambas regiones variables pesada y ligera de un anticuerpo conectado por un conector peptídico y se plegará en una estructura similar a la del anticuerpo de dos péptidos. La molécula de unión de cadena individual presenta varias ventajas sobre anticuerpos convencionales, incluidas las de menor tamaño, mayor estabilidad y más fácil de modificar.

Ku y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(14): 6552-6556 (1995)) dan cuenta de una alternativa a anticuerpos basada en el citocromo b_{562} . Ku y otros (1995) generaron una biblioteca en la que dos de los lazos del citocromo b_{562} se aleatorizaron y se seleccionaron en cuanto a unión frente a albúmina de suero bovino. Se encontraron los mutantes individuales para unirse selectivamente con BSA de manera similar a con anticuerpos anti-BSA.

Lipovsek y otros (patentes U.S. n.º 6.818.418 y n.º 7.115.396) describen un anticuerpo mímico con rasgos de un andamio de fibronectina o proteína de tipo fibronectina y al menos un lazo variable. Conocidos como adnectinas, estos anticuerpos miméticos basados en fibronectina exhiben muchas de las características de anticuerpos naturales o basados en ingeniería, incluidas alta afinidad y especificidad para cualquier ligando diana. Con estos anticuerpos miméticos se puede usar cualquier técnica para desarrollar nuevas o mejoradas proteínas de unión.

La estructura de estos anticuerpos miméticos basados en fibronectina es similar a la estructura de la región variable de la cadena pesada de IgG. Por tanto, estos anticuerpos miméticos exhiben propiedades de unión de antígeno similares en cuanto a naturaleza y afinidad a las de anticuerpos nativos. Además, estos anticuerpos miméticos basados en fibronectina exhiben ciertos beneficios sobre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, estos anticuerpos miméticos no se basan en enlaces disulfuro para la estabilidad de plegado nativa y, por tanto, son

estables en condiciones que normalmente descomponen anticuerpos. Además, dado que la estructura de estos anticuerpos miméticos basados en fibronectina es similar a la de la cadena pesada de IgG, se puede emplear el procedimiento in vitro de aleatorización y arrastre de cadena que es similar al procedimiento de maduración por afinidad de anticuerpos in vivo.

- 5 Beste y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(5): 1898-1903 (1999) dan a conocer un anticuerpo mimético basado en un andamio de lipocalina (ANTICALIN®). Las lipocalinas están compuestas por un barril- β con cuatro lazos hipervariables en el terminal de la proteína. Beste (1999) sometió los lazos a mutagénesis al azar y seleccionó en cuanto a la unión con, por ejemplo, fluoresceína. Tres variantes exhibieron unión específica con la fluoresceína, mostrando una variante una unión similar a la de un anticuerpo antifluoresceína. El análisis posterior reveló que
10 todas las posiciones aleatorizadas son variables, lo que indica que la ANTICALIN® sería adecuada para uso como una alternativa a anticuerpos.

Las ANTICALIN®as son péptidos de cadena individual, pequeños, típicamente de entre 160 y 180 restos, que proporcionan varias ventajas sobre los anticuerpos, incluidas las de coste de producción aminorado, estabilidad al almacenamiento aumentado y reacción inmunológica reducida.

- 15 Hamilton y otros (patente U.S. nº. 5.770.380) describe un anticuerpo mimético sintético que usa el andamio orgánico no peptídico, rígido, del calixareno, unido con múltiples lazos de péptido variables usados como sitios de unión. Todos los lazos de péptido se proyectan geométricamente desde el mismo lado, mutuamente, del calixareno. A causa de esta confirmación geométrica, todos los lazos están disponibles para unir, aumentando la afinidad de unión a un ligando. Sin embargo, en comparación con otros anticuerpos miméticos, el anticuerpo mimético basado en calixareno no está constituido por sólo un péptido y, por tanto, es menos vulnerable al ataque por enzimas proteasa.
20 Tampoco el andamio está constituido puramente por un péptido, ADN o ARN, lo que significa que este anticuerpo mimético es relativamente estable en condiciones ambientales extremas y tiene una larga vida. Además, puesto que el anticuerpo mimético basado en calixareno es relativamente pequeño, es menos probable producir una respuesta inmunogénica.

- 25 Murali y otros (Cell Mol Biol. 49(2): 209-216 (2003) discuten una metodología para reducir anticuerpos en peptidomiméticos más pequeños, los denominan "peptidomiméticos de tipo anticuerpo" (ABiP) que también pueden ser útiles como una alternativa a los anticuerpos.

- Además de marcos de proteína no inmunoglobulínica, también se han mimetizado propiedades anticuerpo en compuestos que comprenden moléculas de ARN y oligómeros no naturales (por ejemplo, inhibidores de proteasa, benzodiazepinas, derivados de purina y derivados miméticos de giro beta. Alternativamente, se pueden usar interacciones conocidas de unión entre, por ejemplo, estreptavidina y biotina para unir la proteína de fusión de gliadina al soporte sólido.
30

- Entre los métodos adicionales para unir la proteína de fusión de gliadina al soporte sólido figuran el uso de conectores homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero inducen la conjugación directa de dos ligandos sin la introducción de cualquier otro material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de enlaces disulfuro pertenecen a esta categoría. Otros ejemplos son los reactivos que inducen la condensación de grupos carboxi y amino primarios formando un enlace amida, tales como carbodiimidas, cloroformiato de etilo, reactivo X1 de Woodward, carbonilimidazol, etc. Los reactivos homobifuncionales pueden presentar dos grupos funcionales idénticos, mientras que los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Una amplia mayoría de agentes reticuladores heterobifuncionales contiene un grupo reactivo a amina y un grupo reactivo a tiol. Un conector heterobifuncional nuevo para acoplamiento de formilo a tiol fue dado a conocer por Heindel, N.D. y otros, Bioconjugate Chem. 2, 427-430 (1991). En una realización preferente, los agentes de reticulación covalentes se seleccionan entre reactivos capaces de formar puentes disulfuro (-S-S-), glicol (-CH(OH)-CH(OH-), azo (-N=N-), sulfona (-S(=O₂)-) o éster (-C(=O)-O-).
40
45

- Los grupos ácido carboxílico que residen en la superficie de perlas de látex paramagnéticas, teñidas internamente con colorantes Luminex, se pueden convertir en ésteres de N-hidroxisuccinimida por la acción de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-p-toluenosulfonato (CMC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Después de separación magnética y lavado, se añade una mezcla de la proteína de fusión de gliadina y tTG en un detergente y una solución salina que contiene CaCl₂ 10 mM a pH 7,4. La suspensión se incuba durante 1 hora con sacudidas a temperatura ambiente. Después de lavar, se bloquean las perlas para reducir la unión no específica y luego se almacenan en diluyente de partículas.
50

III. Procedimiento para determinar si un sujeto sufre la enfermedad celíaca

- La presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto sufre la enfermedad celíaca. El
55 procedimiento incluye poner en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con un antígeno que tiene una proteína de fusión de gliadina inmovilizada sobre un soporte sólido, como se ha descrito antes. El procedimiento incluye también detectar cualquier anticuerpo que se ha unido específicamente al antígeno, indicando así la

presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.

La muestra de la presente invención puede ser cualquier fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra puede ser humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, leche de pecho, fluido intersticial, linfa, moco, fluido pleural, pus, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, fluido cerebroespinal, fluido sinovial o fluido intracelular. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de sangre.

El sujeto de la presente invención puede ser cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser primates (por ejemplo seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano.

La presencia del anticuerpo unido a la proteína de fusión de gliadina inmovilizada sobre el soporte sólido o el complejo de tTG-proteína de fusión puede ser detectada por cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la etapa de detección se puede realizar usando un ensayo tal como ELISA, RIA o un ensayo de inmunofluorescencia. En otras realizaciones, la etapa de detección se puede realizar usando un método enzimático. Entre los inmunoensayos que se pueden usar en la etapa de detección figuran, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos tales como transferencia de manchas Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a una enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de difusión de precipitina en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, y similares. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1999)).

El anticuerpo específico para el antígeno puede ser cualquier anticuerpo adecuado. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser IgG o IgA. Un experto en la técnica apreciará que otros anticuerpos son útiles en la presente invención.

IV. Kits

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un kit que incluye un antígeno según se ha descrito antes, un reactivo de detección y opcionalmente al menos uno entre tampones, sales, estabilizadores, e instrucciones.

Los tampones, las sales y los estabilizadores útiles en la presente invención incluyen los conocidos por un experto en la técnica y se pueden encontrar en Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co. (Easton, Pa), 1990.

V. Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la proteína de fusión de gliadina usando trímero de D2,

Este ejemplo proporciona un método para preparar la proteína de fusión de gliadina de la presente invención usando el trímero de D2.

Se preparó una secuencia de ADN que codifica el trímero de D2, SEC ID NO: 2, se digirió con una enzima de restricción y se insertó en un vector de expresión que contiene un fragmento de ADN que codifica GST, en la posición C-terminal de GST, para expresión de la proteína de fusión de gliadina, SEC ID NO:4.

Ejemplo 2: Preparación del antígeno inmovilizado sin tTG.

Este ejemplo proporciona un método para preparar el antígeno de la presente invención en ausencia de tTG que en general implica la inmovilización de una proteína de fusión de gliadina (trímero de GST-D2) sobre un soporte sólido.

Inmovilización de proteína de fusión de gliadina

Se ponen 8 mg de perlas magnéticas modificadas con carboxilo en un tubo de microcentrifugadora. Se añaden al tubo 800 µl de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50 mM, pH 6,1 en EtOH (etanol) al 70%. Se mezcla y se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta y se rechaza el material sobrenadante. Se repite una vez más.

Se añaden 400 µl de N-hidroxisuccinimida (NHS) 120 mM en MES 50 mM, pH 6,1, en EtOH al 70% en el tubo y se mezcla. Se añaden 400 µl de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-p-toluenosulfonato (CMC) 100 mM en MES 50 mM, pH 6,1 en EtOH al 70% en el tubo y se mezcla. Se mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.

Se separan las perlas del material sobrenadante y se añaden 800 µl de MES 5 mM, pH 6,1. Se mezcla, se separa magnéticamente y se elimina con pipeta el material sobrenadante. Se repite una vez más.

Se ponen en suspensión las partículas lavadas añadiendo 200 µl de MES 5 mM al tubo y se mezcla. Se añade una mezcla de la proteína de fusión de gliadina preparada antes (trímero de GST-D2) y tTG en 600 µl de solución salina que contiene un detergente y cloruro cálcico. Se mezcla durante 60 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se separa magnéticamente, se elimina con pipeta y se descarta el material sobrenadante.

Se añaden 800 µl de tampón de lavado posrevestimiento (solución salina que contiene detergentes, conservantes y cloruro cálcico) al tubo, se mezcla y se separa magnéticamente. Se separa con pipeta y se elimina el material sobrenadante. Se repite tres veces más.

Bloqueo de perlas

- 5 Se añaden al tubo 800 µl de tampón de bloqueo (solución salina que contiene alta proteína con detergentes, conservantes y bloqueantes). Se mezcla durante 60 min a 2-8°C. Se separa magnéticamente. Se separa con pipeta el material sobrenadante y se elimina.

- 10 Se añaden al tubo 800 µl de diluyente de partículas (solución salina tamponada que contiene detergentes, cloruro cálcico, conservantes y bloqueantes). Se mezcla y luego se separa magnéticamente. Se separa con pipeta el material sobrenadante y se elimina. Se repite tres veces más.

Se añaden al tubo 800 µl de diluyente de partículas (100 µl/mg de partículas) y se almacena a 2-8°C en este tampón.

Ejemplo 3. Preparación del antígeno inmovilizado con tTG

- 15 Este ejemplo proporciona un método para preparar el antígeno de la presente invención usando tTG que implica la inmovilización de la proteína de fusión de gliadina (trímero de GST-D2) y tTG sobre el soporte sólido de manera que la tTG y la proteína de fusión queden complejadas juntas mediante reacciones de transamidación. Luego se reticular la tTG y la proteína de fusión de gliadina.

Inmovilización de complejo proteína de fusión de gliadina-tTG

- 20 Se ponen en un tubo de microcentrifugadora 8 mg de perlas magnéticas modificadas con carboxilo. Se añaden al tubo 800 µl de ácido 2-(N-morfolino)metano sulfónico 50 mM (MES), pH 6,1, en EtOH (etanol) al 70%. Se mezcla y se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta y se elimina el material sobrenadante. Se repite una vez más.

- Se añaden en el tubo 400 µl de N-hidroxisuccinimida (NHS) 120 mM en EMS 50 mM, pH 6,1 en EtOH al 70% y se mezcla. Se añaden en el tubo 400 µl de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida meto-p-toluenosulfonato (CMC) 100 mM en MES 50 mM, pH 6,1, en EtOH al 70% y se mezcla. Se mezcla durante 30 min a temperatura ambiente.

- 25 Se separan las perlas del material sobrenadante y se añaden 800 µl de MES 5 mM, pH 6,1. Se mezcla, se separa magnéticamente, se extrae con pipeta y se descarta el sobrenadante. Se repite una vez más.

Las partículas lavadas se ponen en suspensión añadiendo al tubo 200 µl de MES 5 mM y se mezcla. Se añade una mezcla de la proteína de fusión de gliadina preparada antes (trímero de GST-D2) y tTG en 600 µl de solución salina que contiene un detergente y cloruro cálcico. Se mezcla durante 60 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se separa magnéticamente, se extrae el material sobrenadante con pipeta y se descarta.

- 30 Se añaden al tubo 800 µl de tampón de lavado posrevestimiento (solución salina que contiene detergentes, conservantes y cloruro cálcico), se mezcla y se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta. Se repite 3 veces más.

Se añaden al tubo 800 µl de solución salina tamponada que contiene cloruro cálcico, pH 7,4, se mezcla y se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta. Se repite 3 veces más.

- 35 Se añaden al tubo 800 µl de ácido subérico bis sulfo(n-hidroxisuccinimida (BS3) 32 mM en solución salina tamponada que contiene cloruro cálcico, pH 7,4, y se mezcla. Se mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se separa magnéticamente, se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta.

- 40 Se añaden al tubo 800 µl de tampón de lavado posrevestimiento (solución salina tamponada que contiene detergentes, conservantes y cloruro cálcico), se mezcla y se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta. Se repite 3 veces más.

Bloqueo de perlas

Se añaden al tubo 800 µl de tampón de bloqueo (solución salina tamponada con alto contenido de proteína, que contiene detergentes, cloruro cálcico, conservantes y bloqueantes). Se mezcla durante 60 min a 2-8°C. Se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta.

- 45 Se añaden al tubo 800 µl de diluyente de partículas (solución salina tamponada que contiene detergentes, cloruro cálcico, conservantes y bloqueantes). Se mezcla y luego se separa magnéticamente. Se extrae con pipeta el material sobrenadante y se descarta. Se repite 3 veces más.

Se añaden al tubo 800 µl de diluyente de partículas (100 µl/mg de partículas) al tubo y se almacena a 2-8°C en este tampón.

- 50 **Ejemplo 4.** Detección de la enfermedad celíaca usando el antígeno

Este ejemplo proporciona un procedimiento para detectar la enfermedad celíaca usando el antígeno de gliadina recombinante desamidada de la presente invención.

Seguidamente se da un resumen del procedimiento de IgA gastrointestinal e IgG:

- 5
 - El instrumento (BioPlex 2200^{MC} fabricado por Bio-Rad Laboratories) aspira 5 µl del tubo de la muestra y se pasan a un recipiente de reacción (RV) con 45 µl de tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato que contiene detergente y conservantes).
 - Al RV se añaden 100 µl de diluyente de muestra (solución salina que contiene detergentes, conservantes y bloqueantes) y 150 µl de tampón de lavado.
 - Se incuba el RV durante 130 s (2,2 min) a 37°C.
- 10
 - Se añaden al RV 100 µl de reactivo de partículas (una solución de perlas revestidas de antígeno de gliadina recombinante desamidada y perlas revestidas de complejo de proteína de fusión de gliadina-tTG preparadas en los Ejemplos 2 y 3, respectivamente, y diluyente de partículas). La dilución de muestra final es de 1/80.
 - La muestra se incuba durante 1180 s (19,7 min) a 37°C con extracción intermitente.
 - Se lavan las perlas 3 veces con 600 µl, luego con 300 µl, luego con 600 µl de tampón de lavado.
- 15
 - Se añaden al RV 50 µl de reactivo conjugado (una mezcla de IgA antihumana-ficoeritrina en diluyente conjugado (solución salina tamponada que contiene detergentes, conservantes y bloqueantes).
 - La mezcla se incuba durante 600 s (10 min) a 37°C con extracción intermitente.
 - Se lavan las perlas 3 veces con 600 µl, luego con 300 µl, luego con 600 µl de tampón de lavado.
 - Se añaden al RV 50 µl de tampón de lavado.
- 20
 - La suspensión de perlas se aspira al módulo detector Luminex (LDM) y se mide la fluorescencia media de las partículas en cada una de las regiones de perla especificadas.

Ejemplo 5. Sensibilidad en el ensayo de enfermedad celíaca.

El estudio comprendió 122 muestras celíacas (consumiendo gluten en la dieta diaria) junto con otras muestras de IBD y 194 muestras sanas normales.

25

Anticuerpo	Analito	Concordancia química, %		
		Concordancia positiva	Concordancia negativa	Concordancia total
IgA	ITG	74	98	89
	D2	70	98	88
	D2-tTG	77	97	90
IgG	TTF	22	100	73
	D2	69	98	88
	D2-tTG	56	99	84
TTG = perla revestida con transaminasa de tejido; D2 = perla revestida con trómero de D2 D2-tTG = perla revestida con complejo de D2 y tTG				

Anticuerpo	Analito	Número de positivos celíacos
IgA	tTG	90
	D2	86
	D2-tTG	94
IgG	tTG	27
	D2	83
	D2-tTG	68
tTG = perla revestida con transaminasa tisular D2 = perla revestida con trímero de D2; D2-tTG = perla revestida con complejo de D2 y tTG		

5

Un segundo estudio comprendió 126 muestras celíacas (que consumen gluten en la dieta diaria) y 198 muestras sanas normales

Anticuerpo	Analito	Concordancia química, %		
		Concordancia positiva	Concordancia negativa	Concordancia total
IgA	Gliadina	38	98	75
	tTG	76	98	90
	Proteína de fusión de gliadina	73	98	88
IgG	Gliadina	18	98	67
	tTG	38	98	75
	Proteína de fusión de gliadina	67	98	86
Gliadina = perla revestida con gliadina natural entera; tTG = perla revestida con tTG (transaminasa tisular); y proteína de fusión de gliadina = perla revestida con gliadina recombinante desamidada fusionada a proteína GST.				

Ejemplo 6. Datos comparativos del trímero de D2 frente a monómero de D2

10

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 2, se preparó un primer antígeno que comprende el trímero de D2 junto con un segundo antígeno que comprende el monómero de péptido de D2. Se ensayaron los dos antígenos y el antígeno del trímero de D2 alcanzó una señal máxima más alta que el monómero de péptido D2. Véase la Fig. 1.

Revestimiento	Conc. de revestimiento (pmol/mg)		Señal de corte (RFI)	
Conc. (µg/mg)	Péptido D2	Trímero de D2	Péptido D2	Trímero de D2
0,01	4	-	152	-
0,03	13	-	235	-
0,1	42	3	235	75
0,3	126	9	254	127
1	-	30	-	204
3	-	90	-	316
10	-	301	-	421
30	-	904	-	492
100	-	3012	-	644

RFI = intensidad de fluorescencia relativa

Se encontró también que el trímero de D2 tenía una sensibilidad clínica mejor que el antígeno de péptido D2

Anticuerpo	Analito	Concordancia positiva, %	Concordancia negativa, %
IgA	Péptido D2	67	98
IgA	Trímero de D2	73	98
IgG	Péptido D2	66	98
IgG	Trímero de D2	67	98

- 5 Aunque la anterior invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, un experto en la técnica apreciará que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

SEC ID NO:1

QPEQPQSFPEQERPF

- 10 **SEC ID NO:2**

QPEQPQSFPEQERPFGGGGSQPEQPQSFPEQERPFGGGGSQPEQPQSFPEQERPF

SEC ID NO:3

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
 YIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRAYS KDF
 ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
 DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPR

SEC ID NO:4

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRAYSDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRQE
QPQQSFPEQERPFGGGGSQPEQPQQSFPEQERPFGGGGSQPEQPQQSFPEQERPF

SEC ID NO:5

CAGCCC GAACAACCGC AACAATCATT CCCCAGCAA GAAAGGCCGT
TCGGTGGCGG TGGCTCGCAG CCCGAACAAC CGCAACAATC ATTCCCCGAG
CAAGAAAGGC CGTTCGGTGG CGGTGGCTCG CAGCCCGAAC AACCGCAACA
ATCATTCCCC GAGCAAGAAA GGCCGTTC

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno para detectar la enfermedad celíaca, que comprende una gliadina recombinante desamidada que comprende un dímero o trímero de SEC ID NO:1, en el que la gliadina recombinante desamidada está unida covalentemente a una etiqueta formando una proteína de fusión de gliadina, en la que la etiqueta está inmovilizada sobre un soporte sólido.
2. El antígeno de la reivindicación 1, en el que la etiqueta está seleccionada entre una glutatona S-transferasa (GST) y una etiqueta his, preferiblemente
 - (i) la etiqueta es GST, o
 - (ii) el antígeno comprende además transaminasa tisular (tTG) formando un complejo tTG-proteína de fusión de gliadina.
3. El antígeno de la reivindicación 2, en el que la tTG y la proteína de fusión de gliadina están unidas por un reticulador, reticulador que preferiblemente es un miembro seleccionado entre un reticulador heterobifuncional y un reticulador homobifuncional.
4. El antígeno de la reivindicación 3, en el que el reticulador es un reticulador homobifuncional, reticulador que preferiblemente está seleccionado entre el grupo que consiste en bis(sulfosuccinimidil)suberato(BS3), bis[succinimidilsuccinato] de etilenglicol (EGS), bis[sulfosuccinimidilsuccinato] de etilenglicol (sulfo-EGS), bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES), ditiobis(succinimidil)propionato (DSP), 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), suberato de disuccinimidilo (DSS), glutarato de disuccinimidilo (DSG), N-succinimidiladipato de metilo, (MSA), tartrato de disuccinimidilo (DST), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (DFDNB), hidrocioruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC o EDAC), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), hidroxilamina y sulfo-LC-SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridil)ditio)propionato y sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato (sulfo-LC-SPDP), más preferentemente, el reticulador es bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3).
5. El antígeno de la reivindicación 1, en el que
 - (i) la gliadina recombinante desamidada tiene como mínimo una identidad de 95% con SEC ID NO:1, o
 - (ii) la gliadina recombinante desamidada es la SEC ID NO:2.
6. Un antígeno para detectar la enfermedad celíaca preparado por el procedimiento que comprende:
 - (a) poner en contacto un soporte sólido con una proteína de fusión de gliadina, en el que la proteína de fusión de gliadina comprende una gliadina recombinante desamidada que comprende un dímero o trímero de la SEC ID NO:1, estando unida la diamina recombinante desamidada covalentemente a una etiqueta, de manera que la proteína de fusión de gliadina está inmovilizada sobre el soporte sólido mediante la etiqueta, preparando así el antígeno para detectar la enfermedad celíaca.
7. El antígeno de la reivindicación 6, en el que la etiqueta está seleccionada entre una glutatona S-transferasa y una etiqueta his.
8. El antígeno de la reivindicación 6, en el que el procedimiento comprende además poner en contacto la proteína de fusión de gliadina con una transaminasa tisular (tTG), antes de la etapa (a) de poner en contacto, para formar la proteína de fusión de gliadina y la tTG.
9. El antígeno de la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende además (b) poner en contacto el antígeno con un reticulador para reticular la proteína de fusión de gliadina a la tTG.
10. Procedimiento para determinar si un sujeto sufre la enfermedad celíaca, procedimiento que comprende:
 - (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con el antígeno de la reivindicación 1, y
 - (b) detectar cualquier anticuerpo que se haya unido específicamente al antígeno, como una indicación de la presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que
 - (i) la muestra es una muestra de sangre, o
 - (ii) la etapa de detección se realiza usando un ensayo seleccionado entre ELISA o RIA y un ensayo de inmunofluorescencia, o
 - (iii) el anticuerpo específico para el antígeno está seleccionado entre IgG e IgA.
12. Un kit que comprende el antígeno de la reivindicación 1; un reactivo de detección; y, opcionalmente, al menos un miembro seleccionado entre tampones, sales, estabilizadores e instrucciones.

13. Un ácido nucleico aislado que comprende la SEC ID NO:5.
14. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.

Fig. 1