

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2012** **E 16205467 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 3171171**

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

30 Prioridad:

05.12.2011 US 201161567060 P

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

31.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WALKER, ROGER;
LU, YABIN;
DESAI, URVEE y
SHAN, DAMING

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 268 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 desamidada recombinante

Antecedentes de la invención

5 La enfermedad celíaca (EC) es una enfermedad gastrointestinal grave que tiene un fuerte componente genético. La EC se caracteriza por una intolerancia permanente a las proteínas del trigo, cebada, centeno y avena. Aunque la fisiopatología de la EC no se comprende completamente, está claro que la presencia de proteínas tóxicas en la dieta del paciente causa un daño total o parcial de la mucosa intestinal (Brandtzaeg, P. 1997. Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4;9-24) dando lugar a síndromes de malabsorción grave y causando diarrea, vómitos, dolor abdominal, anorexia, retraso en el crecimiento, desnutrición y anemia. La EC 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 EC afecta principalmente a niños menores de tres años, pero también es común en adultos, y algunas veces es clínicamente atípica o asintomática (Ferguson A, y col. 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 EC es más frecuente en pacientes con otra enfermedad genética o autoinmune, como la diabetes mellitus insulino dependiente, el síndrome de Down, la deficiencia selectiva de IgA y la dermatitis herpetiforme (Sirgus N y col. 1993. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. *Acta Paediatr* 66;491-494; Zubillaga P y col. 1993. Down syndrome and coeliac disease. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 16:168-171; Boyce N 1997).

20 Los síntomas clínicos de la EC pueden confundirse con los producidos por otras enfermedades gastrointestinales. En estos casos, la EC se diagnostica erróneamente y los pacientes no reciben el tratamiento específico, es decir, una eliminación completa del gluten en su dieta. Por otra parte, si un paciente no celíaco es diagnosticado erróneamente como celíaco, se sometería a una dieta innecesaria sin gluten durante toda su vida. En consecuencia, un diagnóstico preciso de la EC es esencial. Actualmente, el estándar para el diagnóstico de la EC es la biopsia intestinal, que se repite tres veces: al inicio de los síntomas clínicos, después de varios meses con una dieta libre de gluten y después de un desafío con gluten.

Debido a que la biopsia intestinal es un procedimiento invasivo y que se han desarrollado pruebas serológicas precisas, se han revisado los criterios anteriores (Walker-Smith y col. 1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 65:909-911). En la actualidad, las pruebas serológicas se pueden realizar al inicio de los síntomas clínicos y, cuando son positivas, se indicará una biopsia intestinal confirmatoria. La respuesta al tratamiento con una dieta libre de gluten también puede ser seguida por pruebas serológicas. Si se producen discrepancias entre la respuesta clínica al tratamiento y el resultado de las pruebas serológicas, estaría indicada una segunda biopsia intestinal. Se han desarrollado varias pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, como la detección de anticuerpos contra antígenos celulares o anticuerpos contra antígenos alimentarios, como las gliadinas. Existen kits de diagnóstico para la detección de anticuerpos antiendomiso, anticuerpos antirreticulina, anticuerpos antigliadina y anticuerpos antitransglutaminasa tisular.

40 Los anticuerpos antigliadina (AGA, de sus siglas en inglés) se han utilizado ampliamente para el diagnóstico serológico de la EC (Stern M y col. 1996. Validation and standardization of serological screening tests for coeliac disease in 1996. 3rd EMRC/ESPGAN Workshop, Dec 5-8, 1996, Molsheim, France, págs: 9-24; Catassi C y col. 1999. Quantitative antigliadin antibody measurement in clinical practice: an Italian multicenter study. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31; 366-370). Los AGA se detectan principalmente mediante ELISA (Ensayo inmunsorbente ligado a enzimas), un procedimiento más simple y más objetivo que el IFA (análisis de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta), y puede utilizarse para el análisis de un gran número de muestras. Sin embargo, los AGA son menos específicos para la EC que los anticuerpos endomisiales (EMA, de sus siglas en inglés) y la detección de anticuerpos contra isotipos IgA o IgG requiere dos ensayos independientes. Recientemente se ha informado de un inmunoensayo visual para la detección de AGA, que resuelve algunos de estos problemas (Garrote J A, Sorell L, Alfonso P y col. 1999. A simple visual immunoassay for the screening of coeliac disease. *Eur. J Clin Invest* 29; 697-699; Oficina Española de Patentes y Marcas N.º 9801067).

50 En 1997, Dietrich y col. identificaron transglutaminasa tisular (tTG, de sus siglas en inglés), una proteína de 85 kDa, como el principal antígeno autodetectado por anticuerpos antiendomiso (Dietrich W y col. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the auto antigen of celiac disease. *Nat Med*. 3:797-801). Recientemente se ha informado sobre la detección de anticuerpos anti-tTG en formatos ELISA o de radioligando (RLA) basados en tTG de extractos de hígado de cobaya o tTG humana recombinante clonada de diferentes tejidos (Sulkanen S y col. 1998. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115:1322-1328; Siessler J y col. 1999. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase 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 utilizan epítopos de gliadina específicos o fragmentos de la proteína gliadina en un ensayo, que conduce tanto a falsos negativos como a falsos

positivos. Lo que se necesita es un ensayo que proporcione nuevos antígenos que contengan un conjunto más completo de epítomos que proporcionen un ensayo más preciso para la enfermedad celíaca. Sorprendentemente, la presente invención satisface esta y otras necesidades.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca. El antígeno incluye una gliadina desamidada recombinante o sintética que tiene un hexámero de péptidos que tienen cada uno la SEQ ID NO: 1. En una realización, la gliadina desamidada recombinante o sintética se une covalentemente a un marcador para formar una proteína de fusión gliadina. La proteína de fusión gliadina se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y la gliadina desamidada recombinante o sintética es capaz de unirse a anticuerpos anti gliadina desamidada.

10 En otras realizaciones, la presente invención proporciona la utilización del antígeno de la invención para determinar si un sujeto tiene enfermedad celíaca

En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar la enfermedad celíaca en un sujeto. El procedimiento incluye poner en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con un antígeno de la presente invención. El procedimiento también incluye detectar cualquier anticuerpo que se haya unido específicamente al antígeno, lo que indica la presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un kit que incluye un antígeno de la presente invención, un reactivo de detección y, opcionalmente, al menos uno de tampones, sales, estabilizadores e instrucciones. La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica el antígeno de la invención, así como un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico aislado y una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la purificación del hexámero D2.

La **Figura 2** muestra la titulación del recubrimiento de un hexámero de DGP: intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de la señal de corte del calibrador.

25 La **Figura 3** muestra la titulación del recubrimiento de un hexámero de DGP con una lisina sustituida por el resto de ácido glutámico en la posición 14: IFR de la señal de corte del calibrador.

La **Figura 4** muestra que el hexámero de DGPr tiene sensibilidad mejorada en comparación con el trímero de DGPr.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "contacto" se refiere al procedimiento de poner en contacto al menos dos especies distintas de manera que puedan reaccionar. El producto de reacción resultante se produce directamente a partir de una reacción entre los reactivos añadidos o a partir de un intermedio de uno o más de los reactivos añadidos que se pueden producir en la mezcla de reacción.

35 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "fluido corporal" se refiere a los fluidos de un mamífero que incluyen humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, leche materna, líquido intersticial, linfa, moco, líquido pleural, pus, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, líquido cerebroespinal, líquido sinovial o líquido intracelular. Un experto en la materia apreciará que otros fluidos corporales son útiles en la presente invención.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "reticulante" se refiere a una fracción química o biológica bifuncional o multifuncional que es capaz de unir dos fracciones separadas entre sí. A continuación se describen ejemplos de reticulantes útiles en la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo" incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a animales tales como mamíferos, incluidos primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas y ratones.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inmovilizado" se refiere a la asociación de la tTG, la proteína de fusión gliadina o el complejo tTG-proteína de fusión gliadina con un material de soporte sólido mediante la formación de enlaces covalentes, la formación de enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo o a través de interacciones de Van der Waals. La inmovilización puede ser temporal o permanente.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula que es capaz de estimular una respuesta inmune tal como mediante la producción de anticuerpos. Los antígenos de la presente invención incluyen la proteína de fusión gliadina inmovilizada con soporte sólido y el complejo tTG-proteína de fusión gliadina inmovilizado con soporte sólido. La proteína de fusión gliadina de la presente invención puede incluir una gliadina

desamidada recombinante y un marcador, tal como la proteína glutatión S-transferasa (GST).

Como se utiliza en el presente documento, el término "tampones" se refiere a cualquier ácido o base inorgánica u orgánica que resiste los cambios en el pH y mantiene el pH alrededor de un punto deseado. Los agentes tamponantes útiles en la presente invención incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio dibásico anhidro y mezclas de los mismos. Un experto en la materia apreciará que otros agentes tamponantes son útiles en la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "transglutaminasa tisular (tTG) se refiere a una enzima de la familia transglutaminasa que entrecruza 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 puede utilizarse para detectar la enfermedad celíaca.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína de fusión gliadina" se refiere a una proteína gliadina unida a un marcador, tal como glutatión S-transferasa (GST) o un marcador His. La proteína gliadina incluye una proteína gliadina recombinante o una proteína gliadina sintética. La proteína gliadina está desamidada. Los marcadores son, normalmente, otras proteínas o compuestos que se pueden utilizar como marcadores de afinidad para la purificación, para la solubilización, la cromatografía, como marcadores de epítipo y marcadores fluorescentes. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen BCCP, marcador c-myc, marcador de calmodulina, marcador FLAG, marcador HA, marcador His, marcador-proteína de unión a maltosa, marcador Nus, marcador glutatión S-transferasa (GST), marcador-proteína fluorescente verde, marcador-tiorredoxina, marcador-S, marcador Strep II, marcador Sof 1, marcador Sof 3, marcador-T7, péptidos de tipo elastina, dominio de unión a quitina y xilanasas 10A. Un experto en la materia apreciará que otras proteínas son útiles en las proteínas de fusión de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "complejo tTG-proteína de fusión gliadina" se refiere a un complejo formado cuando la tTG y la proteína de fusión gliadina se unen entre sí. La tTG y la proteína de fusión gliadina se pueden unir de varias maneras, bajo una diversidad de reacciones. La tTG se puede unir a uno o a ambos del marcador y la gliadina desamidada recombinante de la proteína de fusión gliadina.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "gliadina desamidada recombinante" se refiere a una proteína gliadina desamidada preparada mediante ingeniería genética. Las proteínas desamidadas son aquellas que tienen algunos o todos los grupos funcionales de amida libres hidrolizados a ácidos carboxílicos, tales como la conversión de glutaminas en ácido glutámico. Las gliadinas desamidadas recombinantes útiles en la presente invención comprenden péptidos que tienen la SEQ ID NO: 1 o comprenden un hexámero que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

Como se utiliza en el presente documento, el término "reticulado" se refiere a la formación de más de un enlace entre dos fracciones químicas diferentes. En la presente invención, las fracciones químicas pueden ser especies biológicas tales como proteínas, enzimas y anticuerpos, o materiales de soporte sólido. La funcionalidad química que une las fracciones químicas individuales que están entrecruzadas, se denomina "reticulante". Un reticulante es, normalmente, un compuesto bifuncional que reacciona con un grupo funcional reactivo en una fracción química y un grupo funcional reactivo en otra fracción química, uniendo así las dos fracciones químicas entre sí. Los reticulantes pueden ser reticulantes homobifuncionales o reticulantes heterobifuncionales. Los reticulantes homobifuncionales son aquellos en los que los grupos funcionales del reticulante homobifuncional que reaccionan con cada fracción química son los mismos. Los reticulantes heterobifuncionales son aquellos en los que los grupos funcionales del reticulante heterobifuncional que reaccionan con cada fracción química son diferentes. Los reticulantes homobifuncionales y heterobifuncionales preferidos de la presente invención se describen con mayor detalle a continuación.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son lo mismo (*es decir*, 60 % de identidad, preferentemente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad en una región específica), cuando se compara y alinea para correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba.

La frase "sustancialmente idéntica", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a una secuencia o subsecuencia que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia. Como alternativa, el porcentaje de identidad puede ser cualquier número entero del 40 % al 100 %. Preferido es una identidad de al menos: 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % comparado con una secuencia de referencia que utiliza los programas descritos en el presente documento; preferentemente BLAST utilizando parámetros estándar, como se describe a continuación.

Para la comparación de secuencias, normalmente, una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, se utilizan los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 y los parámetros por defecto discutidos a continuación.

Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) y Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. Se utilizan BLAST y BLAST 2.0, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP, de sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col., *supra*). Estos aciertos de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos que no coinciden; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, *por ejemplo*, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, más preferentemente inferior a 0,01, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es reactivo inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos producidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es, normalmente, sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo 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 rigurosas. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden utilizarse para amplificar la secuencia.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan como sinónimos y se refieren a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas del extremo 5' al 3'. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, pueden utilizarse análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato o O-metilfosforamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press); y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas, y cadenas principales sin ribosa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos o polinucleótidos también pueden incluir nucleótidos modificados, que permiten la lectura correcta a través de una polimerasa. "Secuencia de polinucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" incluye tanto las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico como cadenas simples individuales o en un dúplex. Como apreciarán los expertos en la materia, la descripción de una cadena simple también define la secuencia de la cadena complementaria; por lo tanto, las secuencias descritas en el presente documento también proporcionan el

complemento de la secuencia. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como también la secuencia explícitamente indicada. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo y ribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina.

Como se utiliza en el presente documento, 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 un ARNr, un ARNt, o la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína o péptido específico, o un sitio de unión para un agente regulador en funciones. Esta frase abarca específicamente codones degenerados (*es decir*, diferentes codones que codifican un único aminoácido) de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para adaptarse a la preferencia de codón en una célula hospedadora específica.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "específicamente unido" se refiere a la captura o atrapamiento del antígeno de la presente invención por un anticuerpo que es indicativo de la presencia de la enfermedad celíaca. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo antigliadina desamidada) se une a un antígeno de la presente invención al menos dos veces sobre el nivel de referencia y más normalmente al menos 5, 10, 20, 30, 40 o 50 veces sobre el nivel de referencia. Se puede utilizar una diversidad de formatos de inmunoensayo para determinar si un anticuerpo se une específicamente a un antígeno de la presente invención. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida se utilizan de forma rutinaria para determinar si un anticuerpo es específicamente inmunorreactivo con una proteína (*véase, por ejemplo*, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998) para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica).

II. Antígeno

La presente invención proporciona un antígeno y un procedimiento para la detección de la enfermedad celíaca. El antígeno puede incluir una proteína de fusión gliadina inmovilizada en un material de soporte sólido. La proteína de fusión gliadina incluye tanto una gliadina desamidada recombinante como un marcador. El antígeno puede incluir opcionalmente transglutaminasa tisular (tTG). Cuando están presentes, la proteína de fusión gliadina y la tTG se pueden unir covalentemente antes de la inmovilización en el soporte sólido, tal como a través de transamidación, para formar un complejo tTG-proteína de fusión gliadina. Después de la inmovilización del complejo tTG-proteína de fusión gliadina en el soporte sólido, la proteína de fusión gliadina y la tTG se pueden entrecruzar utilizando reticulantes adecuados.

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

En otras realizaciones, la presente invención proporciona un antígeno para detectar la enfermedad celíaca. El antígeno incluye una gliadina desamidada recombinante que tiene un hexámero de péptidos que tienen cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 1, en el que la gliadina desamidada recombinante se une covalentemente a un marcador para formar una proteína de fusión gliadina. La proteína de fusión gliadina se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y la gliadina desamidada recombinante es capaz de unirse a anticuerpos antigliadina desamidada.

A. Proteína de fusión gliadina

La proteína de fusión gliadina útil en la presente invención incluye una gliadina desamidada recombinante que se expresa como una proteína marcada. Un experto en la materia reconocerá que muchas proteínas gliadina recombinante son útiles en el procedimiento de la presente invención. La proteína gliadina recombinante de la presente invención es un hexámero de D2 (Aleanzi y col., *Clin Chem* 2001,47 (11), 2023), secuencia peptídica: QPEQPQSFPEQERPF (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína gliadina recombinante es un hexámero de D2, separado por cualquier espaciador adecuado, tal como GGGGS (SEQ ID NO: 2). Un experto en la materia apreciará que otros espaciadores son útiles en la presente invención.

Las secuencias espaciadoras de péptidos típicas contienen restos de Gly, Ser, Ala y Thr. El espaciador útil incluye polímeros de glicina-serina que incluyen, por ejemplo, (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 13), (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 14) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 15), en el que n es un número entero de al menos uno; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles.

En algunas realizaciones, el hexámero incluye un espaciador que separa cada péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, cada espaciador puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la gliadina desamidada recombinante es un hexámero de D2 (SEQ ID NO: 3). En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. Las proteínas de gliadina desamidada recombinante de la presente invención se unen a anticuerpos antigliadina desamidada y, por lo tanto, pueden diagnosticar sujetos que tienen trastornos relacionados con el gluten tales como la enfermedad celíaca. Un experto en la materia apreciará

que otras proteínas de gliadina desamidada recombinante son útiles en la presente invención.

La proteína de fusión gliadina también incluye un marcador. Cualquier marcador conocido en la materia es útil en las proteínas de fusión gliadina de la presente invención. Los marcadores adecuados en el antígeno de la presente invención incluyen una Glutación S-transferasa (GST), marcador His, FLAG, marcador Strep II, marcador HA, marcador Sof 1, marcador Sof 3, c-myc, marcador-T7, marcador-S, péptidos de tipo elastina, dominio de unión a quitina, tiorredoxina, xilanasasa 10A, proteína de unión a maltosa y NusA. En algunas realizaciones, el marcador es una glutación S-transferasa (GST) o un marcador His. Un experto en la materia apreciará que otros marcadores son útiles en la presente invención. El marcador, normalmente, se une a la proteína gliadina recombinante a través de un enlace covalente.

El marcador His útil en la presente invención puede ser cualquier marcador His adecuado. Los marcadores His adecuados en la presente invención incluyen la secuencia de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el marcador His puede ser la secuencia de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En otras realizaciones, la gliadina desamidada recombinante puede ser la secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

En otra realización, el marcador es una proteína glutación S-transferasa (GST). La proteína GST (SEQ ID NO: 10) cumple muchas funciones, que incluyen permitir la purificación de la proteína gliadina recombinante y la presentación de epítomos representados en la proteína gliadina recombinante.

Cuando la proteína de fusión gliadina incluye GST y la gliadina desamidada recombinante es el hexámero de D2, la proteína de fusión gliadina está representada por la secuencia de SEQ ID NO: 11. La proteína de fusión gliadina de la presente invención se puede preparar por una diversidad de procedimientos, que incluyen procedimientos recombinantes tales como los descritos.

La inmovilización de la proteína de fusión gliadina en el soporte sólido se puede lograr mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. La inmovilización de la proteína de fusión gliadina en el soporte sólido puede ser a través de la formación de enlaces covalentes o iónicos, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, así como mediante interacciones anticuerpo-antígeno. Un experto en la materia apreciará que otros procedimientos de inmovilización son útiles en la presente invención.

En algunas realizaciones, el antígeno también incluye transglutaminasa tisular (tTG). Cuando la tTG está presente, la tTG y la proteína de fusión gliadina forman un complejo tTG-proteína de fusión gliadina. La tTG y la proteína de fusión gliadina se pueden unir de varias maneras, tales como mediante la formación de enlaces covalentes, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o mediante interacciones de Van der Waals. Cuando la tTG y la proteína de fusión gliadina se unen covalentemente, los enlaces covalentes se pueden formar mediante una diversidad de reacciones, tales como la transamidación. La transamidación puede ocurrir bajo una diversidad de condiciones, tales como en presencia de Ca^{2+} . La tTG se puede unir a uno o a ambos del marcador y la gliadina desamidada recombinante de la proteína de fusión gliadina. El tTG se inmoviliza al soporte sólido en las mismas condiciones y al mismo tiempo que la inmovilización de la proteína de fusión gliadina. La transglutaminasa tisular es conocida por los expertos en la materia y se ha descrito anteriormente, véase NCBI RefSeq NP_004604 y NP_945189 (April 13, 2008).

En otras realizaciones, la tTG y la proteína de fusión gliadina están unidas covalentemente mediante un reticulante. Un experto en la materia apreciará que otros procedimientos de entrecruzamiento están disponibles, tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o mediante fuerzas de Van der Waals. Un experto en la materia reconocerá que cualquier reticulante es útil en la presente invención. En algunas realizaciones, el reticulante es un miembro seleccionado entre un reticulante heterobifuncional y un reticulante homobifuncional. En algunas otras realizaciones, el reticulante es un reticulante homobifuncional. En algunas otras realizaciones más, el reticulante es un miembro seleccionado entre bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3), etilenglicol bis[succinimidilsuccinato] (EGS), etilenglicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato] (sulfo-EGS), bis[2-(succinimidooxi-carboniloxi)etil]sulfona (BSOCOES), ditiobis(succinimidil)propionato (DSP), 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil glutarato (DSG), metil N-succinimidil adipato (MSA), disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), clorhidrato 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-piridilditio) -propionato) y sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio] -propionamido)hexanoato (sulfo-LC-SPDP). En otra realización, el reticulante es bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3).

En una realización adicional, la gliadina desamidada recombinante tiene un 95 % de identidad a la SEQ ID NO: 3. En algunas otras realizaciones, la gliadina desamidada recombinante tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.

B. Soporte sólido

Un material de soporte sólido para su uso en la presente invención se caracteriza por las siguientes propiedades: (1) insolubilidad en fases líquidas utilizadas para el cribado; (2) capaz de movilidad en tres dimensiones, independiente de todos los demás soportes; (3) que contiene muchas copias de la proteína de fusión gliadina o el complejo tTG-proteína de fusión gliadina; (4) compatibilidad con las condiciones del ensayo de cribado; y (5) ser inerte a las condiciones del ensayo. Un soporte preferido también tiene grupos funcionales reactivos, que incluyen hidroxilo,

carboxilo, amino, tiol, aldehído, halógeno, nitro, ciano, amido, urea, carbonato, carbamato, isocianato, sulfona, sulfonato, sulfonamida y sulfóxido para unir la proteína de fusión gliadina y tTG.

Como se utiliza en el presente documento, el material de soporte sólido no está limitado a un tipo específico de soporte. Más bien, hay una gran cantidad de soportes disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas de plástico derivatizadas, perlas tales como de vidrio, plástico o perlas magnéticas, algodón, geles de alúmina y polisacáridos tales como sefarsa. Otros soportes sólidos pueden ser placas de microtitulación ELISA. Se puede seleccionar un soporte de fase sólida adecuado en función del uso final deseado y la idoneidad para diversos protocolos sintéticos. Por ejemplo, en la síntesis de poliamida, el soporte de fase sólida útil puede ser resinas tales como poliestireno (por ejemplo, resina PAM obtenida de Bachem Inc., Península Laboratories), resina POLYHIPE™ (obtenida de Aminotech, Canada), resina de poliamida (obtenida de Península Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen, Germany), resina de polidimetilacrilamida (disponible de Milligen/Bio search, California), o perlas PEGA (obtenidas de Polymer Laboratories). Los soportes de síntesis en fase sólida preferidos para síntesis específicas se describen a continuación. El soporte sólido puede ser una perla. Un experto en la materia reconocerá que muchos tipos de soportes sólidos son útiles en la presente invención.

C. Procedimiento para la preparación del antígeno de gliadina desamidada recombinante

En el presente documento se incluye un antígeno para detectar la enfermedad celíaca preparado mediante el procedimiento que incluye poner en contacto un soporte sólido con una proteína de fusión gliadina, en el que la proteína de fusión gliadina incluye una gliadina desamidada recombinante que tiene un hexámero de péptidos que tienen cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 1 y en la que la gliadina desamidada recombinante se une covalentemente a un marcador, de modo que la proteína de fusión gliadina se inmoviliza en el soporte sólido. Por lo tanto, se prepara el antígeno para detectar la enfermedad celíaca.

El procedimiento de preparación del antígeno de gliadina desamidada recombinante puede preparar cualquier antígeno de gliadina desamidada recombinante descrito anteriormente.

El marcador es como se describió anteriormente. El marcador puede ser GST o un marcador His. El marcador puede ser GST. En algunas realizaciones, la proteína de fusión gliadina puede inmovilizarse sobre el soporte sólido a través del marcador.

El soporte sólido es como se describió anteriormente. El soporte sólido puede ser una perla, tal como una perla magnética. El soporte sólido puede tener un grupo reactivo funcional.

Cuando la tTG está presente, el procedimiento también puede incluir formar un enlace covalente entre la proteína de fusión gliadina y la tTG antes de la etapa de contacto para formar un complejo tTG-proteína de fusión gliadina. El procedimiento de formación de un enlace covalente entre la proteína de fusión gliadina y la tTG también puede ocurrir durante y/o después de la etapa de contacto. La formación del complejo de la proteína de fusión gliadina y la tTG puede tener lugar por cualquier procedimiento conocido en la materia. La formación del complejo puede ocurrir por transamidación para formar un enlace covalente.

El procedimiento puede comprender además poner en contacto el soporte sólido con un reticulante para entrecruzar la proteína de fusión gliadina y la tTG. El reticulante puede entrecruzar la proteína GST con la tTG. Un experto en la materia apreciará que cualquier reticulante es útil en este procedimiento, tales como los descritos anteriormente. El entrecruzamiento puede ocurrir a través de la formación de enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes o iónicos.

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 desamidada recombinante. Los textos básicos que desvelan los procedimientos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª Ed, 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., 1994-1999).

Una gliadina desamidada recombinante o una proteína de fusión, por ejemplo, que comprende gliadina desamidada recombinante y un marcador tal como un marcador GST o un marcador His, se puede expresar utilizando técnicas bien conocidas en la materia. Se pueden utilizar células hospedadoras eucariotas y procariotas, tales como células animales, células de insectos, bacterias, hongos y levaduras. Los procedimientos para el uso de células hospedadoras en la expresión de ácidos nucleicos aislados son bien conocidos por los expertos en la materia y se pueden encontrar, por ejemplo, en la referencia general, *supra*. En consecuencia, la presente invención también proporciona células hospedadoras y vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento.

Los ácidos nucleicos que codifican una gliadina desamidada recombinante o una proteína de fusión, por ejemplo, que comprende gliadina desamidada recombinante y un marcador tal como un marcador GST o un marcador His, pueden hacerse utilizando técnicas recombinantes o sintéticas estándar. Los ácidos nucleicos pueden ser ARN,

ADN o híbridos de los mismos. Un experto puede construir una diversidad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que codifican el mismo polipéptido. Las metodologías de clonación para lograr estos fines, y los procedimientos de secuenciación para verificar la secuencia de ácidos nucleicos son bien conocidos en la materia.

5 Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro*. Los desoxinucleótidos pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862 (1981), utilizando un sintetizador automático, *por ejemplo*, como se describe en Needham-VanDevanter, y col., *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168 (1984). Los ácidos nucleicos que codifican la proteína deseada pueden obtenerse mediante una reacción de amplificación, por ejemplo, PCR.

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

15 Un experto puede seleccionar un ácido nucleico o polipéptido deseado basándose en las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento y el conocimiento fácilmente disponible en la materia con respecto a la estructura y función de la gliadina desamidada recombinante. Las características físicas y las propiedades generales de estas proteínas son conocidas por los profesionales expertos.

20 Para obtener una expresión de alto nivel de una gliadina desamidada recombinante o una proteína de fusión que comprende gliadina desamidada recombinante y un marcador tal como un marcador GST o un marcador His, se construye un vector de expresión que incluye tales elementos como un promotor para la transcripción directa, un finalizador de transcripción/traducción y un sitio de unión de ribosoma para la iniciación de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en las referencias que proporcionan los procedimientos y protocolos de clonación de expresión citados anteriormente. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar ribonucleasa están disponibles en, *por ejemplo*, *E. coli*, *Bacillus sp.*, y *Salmonella* (véase, también, Palva, y col., *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach, y col., *Nature* 302:543-545 (1983)).
25 Los kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras y células de insectos son bien conocidos en la materia y también están disponibles comercialmente.

30 Además del promotor, el vector de expresión normalmente contiene una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico en las células hospedadoras. Un casete de expresión típico contiene así un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la gliadina desamidada recombinante o la proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión gliadina desamidada recombinante-GST) y las señales requeridas para la poliadenilación eficaz de la transcripción, sitios de unión a ribosomas y terminación de la traducción. Dependiendo del sistema de expresión, la secuencia de ácido nucleico que codifica la gliadina desamidada recombinante o proteína de fusión
35 (por ejemplo, proteína de fusión gliadina desamidada recombinante-GST) puede unirse a una secuencia de péptido señal escindible para promover la secreción de la proteína codificada por la célula transformada.

Como se indicó anteriormente, el casete de expresión también debe contener una región de terminación de la transcripción cadena abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación puede obtenerse a partir del mismo gen que la secuencia promotora o puede obtenerse de diferentes genes.

40 El vector de expresión particular utilizado para transportar la información genética a la célula no es particularmente crítico. Puede utilizarse cualquiera de los vectores convencionales utilizados para la expresión en células eucariotas o procariontas. Los vectores de expresión bacterianos estándar incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET15b, pET23D, pET-22b(+) y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. Los marcadores de epítipo también se pueden añadir a las proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos
45 convenientes de aislamiento, por ejemplo, 6-his. Estos vectores comprenden, además del casete de expresión que contiene la secuencia codificante, el promotor T7, el iniciador y finalizador de la transcripción, el sitio ori pBR322, una secuencia de codificación bla y un operador lacI.

50 Los vectores que comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de RNasa o las proteínas de fusión pueden expresarse en una diversidad de células hospedadoras, que incluyen *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y las líneas celulares de mieloma. Además de las células, los vectores pueden expresarse por animales transgénicos, preferentemente ovejas, cabras y ganado. Normalmente, en este sistema de expresión, la proteína recombinante se expresa en la leche de animales transgénicos.

55 Los plásmidos o vectores de expresión de la invención se pueden transferir a la célula hospedadora elegida mediante procedimientos bien conocidos tales como transformación de cloruro de calcio para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, fusión liposómica o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por resistencia a los antibióticos conferidos por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo y hyg.

Una vez expresada, la proteína expresada se puede purificar de acuerdo con los procedimientos estándar de la materia, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía en columna (que incluye la cromatografía de afinidad) y la electroforesis en gel (véase, generalmente, R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sambrook and Ausubel, ambos *supra*).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que incluye la secuencia de SEQ ID NO: 9, que codifica una secuencia del hexámero de D2 de proteína gliadina recombinante. En otras realizaciones, el ácido nucleico aislado está en un vector de expresión. En algunas otras realizaciones, el vector de expresión está en una célula hospedadora.

10 2. Inmovilización en el soporte sólido

La proteína de fusión gliadina de la presente invención se puede inmovilizar en cualquier material de soporte sólido útil mediante cualquier procedimiento de inmovilización útil conocido en la materia. La inmovilización de la proteína de fusión gliadina en el soporte sólido puede ser a través de la formación de enlaces covalentes o iónicos, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, así como mediante interacciones anticuerpo-antígeno. Un experto en la materia apreciará que otros procedimientos de inmovilización son útiles.

Se han desarrollado otros compuestos que permiten la inmovilización de una manera similar a los anticuerpos. Algunos de estos "imitadores de anticuerpos" utilizan estructuras de proteínas que no son inmunoglobulinas como marcos proteicos alternativos para las regiones variables de los anticuerpos.

Por ejemplo, Ladner y col. (Patente de los Estados Unidos 5.260.203) describen moléculas de unión de cadena polipeptídica única con especificidad de unión similar a la de la región variable de la cadena ligera y pesada agregada, pero molecularmente separada, de los anticuerpos. La molécula de unión de cadena simple contiene los sitios de unión a antígeno tanto de las regiones variables pesadas como ligeras de un anticuerpo conectado mediante un enlazador peptídico y se plegará en una estructura similar a la de los dos anticuerpos peptídicos. La molécula de unión de cadena simple presenta varias ventajas sobre los anticuerpos convencionales, que incluyen, tamaño más pequeño, mayor estabilidad y se modifican más fácilmente.

Ku y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(14):6552-6556 (1995)) desvelan una alternativa a los anticuerpos basada en el citocromo b_{562} . Ku y col. (1995) generaron una biblioteca en la que dos de los bucles del citocromo b_{562} se aleatorizaron y se seleccionaron para su unión contra la albúmina de suero bovino. Se encontró que los mutantes individuales se unen selectivamente con BSA de manera similar con anticuerpos anti-BSA.

Lipovsek y col. (Patentes de Estados Unidos 6.818.418 y 7.115.396) desvelan un imitador de anticuerpo que presenta una fibronectina o estructura de proteína de tipo fibronectina y al menos un bucle variable. Conocidos como adnectinas, estos imitadores de anticuerpos basados en fibronectina exhiben muchas de las mismas características de anticuerpos naturales o modificados genéticamente, que incluyen alta afinidad y especificidad para cualquier ligando diana. Cualquier técnica para desarrollar proteínas de unión nuevas o mejoradas puede utilizarse con estos imitadores de anticuerpos.

La estructura de estos imitadores de anticuerpos basados en fibronectina es similar a la estructura de la región variable de la cadena pesada de IgG. Por lo tanto, estos imitadores muestran propiedades de unión a antígeno similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos nativos. Además, estos imitadores de anticuerpos basados en fibronectina exhiben ciertos beneficios sobre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, estos imitadores de anticuerpos no se basan en enlaces disulfuro para la estabilidad de pliegue nativo, y son, por lo tanto, estables en condiciones que normalmente degradarían los anticuerpos. Además, dado que la estructura de estos imitadores de anticuerpos basados en fibronectina es similar a la de la cadena pesada de IgG, el procedimiento para aleatorización y reorganización del bucle puede emplearse *in vitro* que es similar al procedimiento de maduración de afinidad de anticuerpos *in vivo*.

Beste y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(5):1898-1903 (1999)) desvelan un imitador de anticuerpos basado en una estructura de lipocalina (ANTICALIN®). Las lipocalinas se componen de un barril β con cuatro bucles hipervariables en el extremo de la proteína. Beste (1999), sometió los bucles a mutagénesis aleatoria y seleccionó para unirse con, por ejemplo, fluoresceína. Tres variantes mostraron unión específica con fluoresceína, con una variante que muestra una unión similar a la de un anticuerpo antifluoresceína. Un análisis adicional reveló que todas las posiciones aleatorizadas son variables, lo que indica que ANTICALIN® sería adecuado para utilizarse como una alternativa a los anticuerpos.

ANTICALINS® son péptidos pequeños de cadena simple, normalmente entre 160 y 180 restos, lo que proporciona varias ventajas sobre los anticuerpos, que incluye menor coste de producción, mayor estabilidad en el almacenamiento y disminución de la reacción inmunológica.

Hamilton y col. (Patente de Estados Unidos 5.770.380) desvelan un imitador de anticuerpo sintético que utiliza la estructura orgánica no peptídica rígida del calixareno, unido con múltiples bucles peptídicos variables utilizados como sitios de unión. Todos los bucles peptídicos proyectan desde el mismo lado geométricamente desde el

calixareno, con respecto a los otros. Debido a esta confirmación geométrica, todos los bucles están disponibles para la unión, lo que aumenta la afinidad de unión a un ligando. Sin embargo, en comparación con otros imitadores de anticuerpos, el imitador de anticuerpos basado en calixareno no consiste exclusivamente en un péptido y, por lo tanto, es menos vulnerable al ataque de las enzimas proteasas. Tampoco la estructura consiste únicamente en un péptido, ADN o ARN, lo que significa que este imitador de anticuerpos es relativamente estable en condiciones ambientales extremas y tiene una larga vida útil. Además, dado que el imitador del anticuerpo basado en calixareno es relativamente pequeño, es menos probable que produzca una respuesta inmunogénica.

Murali y col. (Cell Mol Biol 49 (2): 209-216 (2003)) describen un procedimiento para reducir anticuerpos en peptidomiméticos más pequeños, que denominan "peptidomiméticos de unión de tipo anticuerpo" (ABiP, de sus siglas en inglés) que también pueden ser útiles como una alternativa a los anticuerpos.

Además de los marcos proteicos que no son inmunoglobulinas, las propiedades del anticuerpo también se han imitado en compuestos que comprenden moléculas de ARN y oligómeros no naturales (por ejemplo, inhibidores de proteasas, benzodiazepinas, derivados de purina e imitadores de vuelta beta). Como alternativa, las interacciones de unión conocidas entre, por ejemplo, estreptavidina y biotina, se pueden utilizar para unir la proteína de fusión gliadina al soporte sólido.

Los procedimientos adicionales para unir la proteína de fusión gliadina al soporte sólido incluyen el uso de enlazadores homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de entrecruzamiento de longitud cero inducen la conjugación directa de dos ligandos sin la introducción de ningún material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de enlaces disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son reactivos que inducen la condensación de grupos carboxi y amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidias, etilcloroformiato, reactivo de Woodward K1 y carbonildiimidazol. Los reactivos homobifuncionales tienen dos grupos funcionales idénticos, mientras que los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Una gran mayoría de los agentes reticulantes heterobifuncionales contienen un grupo reactivo con aminas primarias y un grupo reactivo con tiol. Un novedoso enlazador heterobifuncional para el acoplamiento de formilo a tiol fue desvelado por Heindel, N. D. y col., Bioconjugate Chem. 2, 427-430 (1991). Los agentes de entrecruzamiento covalentes pueden seleccionarse preferentemente de reactivos capaces de formar puentes disulfuro (-SS-), glicol (-CH(OH)-CH(OH)-), azo (-N=N-), sulfona (-S). (=O2)-), o de éster (-C(=O)-O-).

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

III. Procedimiento para diagnosticar a un sujeto con enfermedad celíaca

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto tiene enfermedad celíaca. El procedimiento incluye poner en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con un antígeno de la presente invención, que incluye una gliadina desamidada recombinante que incluye un hexámero que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3. El procedimiento también incluye detectar cualquier anticuerpo que se haya unido específicamente al antígeno, lo que indica la presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.

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

El sujeto de la presente invención puede ser cualquier mamífero. El sujeto puede ser primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas y ratones. El sujeto puede ser un ser humano.

La presencia del anticuerpo unido al complejo tTG-proteína de fusión gliadina o a la proteína de fusión gliadina inmovilizada con soporte sólido puede detectarse por cualquier medio conocido en la materia. En algunas realizaciones, la etapa de detección se puede realizar utilizando un ensayo tal como ELISA, un RIA o un ensayo de inmunofluorescencia. Como alternativa, la etapa de detección se puede realizar utilizando un procedimiento enzimático. Los inmunoensayos que se pueden utilizar en la etapa de detección incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. 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. El anticuerpo puede ser IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser IgG o IgA. Un experto en la materia apreciará que otros anticuerpos son útiles en la presente invención.

IV. Kits

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un kit que incluye un antígeno como se describió anteriormente, en el que la gliadina desamidada recombinante incluye un hexámero que es sustancialmente idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 3 o que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, un reactivo de detección y, opcionalmente, al menos uno de tampones, sales, estabilizadores e instrucciones.

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

V. Ejemplos

Ejemplo 1. Purificación del Hexámero de D2 con marcador His

15 Se puede purificar el hexámero de D2 con marcador His utilizando condiciones nativas o desnaturizantes. En este ejemplo, se purificó el hexámero de D2 en la condición de desnaturización con urea 8 M. Se hizo un hexámero de D2 "clásico" con marcador His en el que la proteína tenía la secuencia de SEQ ID NO: 7. Además, se hizo un hexámero de D2 "que contenía lisina" con marcador His en el que la proteína tenía la secuencia de SEQ ID NO: 8.

20 **Purificación del hexámero recombinante clásico.** Se suspendieron las células lisadas del cultivo de 6 litros de *E. coli* que sobreexpresan el hexámero en el tampón de equilibrio (NaH₂PO₄ 100 mM, Urea 8 M, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) a aproximadamente 5 ml/g de peso húmedo. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación. Se añadieron aproximadamente 200 ml de sobrenadante a 25 ml de resina Ni-NTA previamente lavada con el tampón de equilibrio y se mezclaron durante 60 min a temperatura ambiente. Las proteínas hexaméricas unidas a la resina se separaron del lisado no unido antes de lavarse cuatro veces con 100 ml de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8 M, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, Triton X100 al 0,5 %, pH 8,0). Después de que el tampón de lavado se eliminara de la resina, se eluyeron las proteínas hexaméricas unidas con cuatro volúmenes de 20 ml de tampón de elución (NaH₂PO₄ 100 mM, urea 8 M, NaCl 200 mM, imidazol 250 mM, pH 7,5). Las fracciones de proteína eluidas se combinaron, se concentraron y se dializaron frente a MOPS 10 mM, NaCl 150 mM (pH 7,4). Se eliminaron las precipitaciones observadas mediante centrifugación a 15 kxg. Las proteínas purificadas por afinidad pueden purificarse adicionalmente con una columna de exclusión de tamaño con MOPS 10 mM, NaCl 150 mM (pH 7,4), controlarse con UV a 230 nm. Las fracciones que contienen el primer pico principal se juntaron y se concentraron.

El procedimiento de purificación de la proteína recombinante del hexámero de D2 que contiene lisina era idéntico al del hexámero recombinante clásico.

35 **Caracterización de las proteínas hexaméricas clásicas o que contienen lisina purificadas.** Se analizó la proteína purificada por afinidad mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (Figura 1). Los hexámeros de D2, que se purificaron adicionalmente en la columna de exclusión de tamaño como se describió anteriormente, se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 1). Inesperadamente, ambos hexámeros (clásico y el que contiene lisina) mostraron una banda mayor de alrededor de 45 kd, que corresponde al tamaño de un trímero de proteínas hexaméricas. Esta agregación de los hexámeros es tan fuerte que no se disocia en las condiciones de desnaturización utilizadas en SDS-PAGE. Además, ambas proteínas hexaméricas migraron en la posición de aproximadamente 45 kd en un cromatograma de exclusión por tamaño. Sin quedar ligados a una teoría particular, la sorprendente tendencia de los hexámeros a agregarse para formar un trímero de hexámeros puede contribuir a la inmunorreactividad mejorada del hexámero de D2.

Ejemplo 2. Preparación del antígeno de gliadina desamidada recombinante

45 Este ejemplo proporciona un protocolo que se utilizó para la preparación de la proteína gliadina desaminada recombinante marcada con His "clásica" (SEQ ID NO: 7).

Inmovilización del antígeno del péptido de la gliadina desamidada recombinante (DGP, de sus siglas en inglés) en perlas magnéticas

50 Se colocan 10 mg de perlas magnéticas modificadas con carboxilo en un tubo de microcentrífuga. Se añaden 1000 µl de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 50 mM, pH 6,1 en etanol al 70 % (EtOH) al tubo. El tubo se agita en vórtice y las perlas se separan magnéticamente. El sobrenadante se pipetea y se descarta. Este procedimiento de lavado se repite una vez más.

Se añaden 500 µl de N-hidroxisuccinimida (NHS) 120 mM en MES 50 mM, pH 6,1 en EtOH al 70 % en el tubo con perlas y se mezcla. Se añaden 500 µl de meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil) carbodiimida

(CMC) en MES 50 mM, pH 6,1 en EtOH al 70 % en el mismo tubo con perlas y se mezcla. Se incuba el tubo a temperatura ambiente durante 30 minutos mientras se mezcla continuamente.

5 Se separan las perlas del sobrenadante y se añaden 1000 µl de MES 5 mM, pH 6,1 en EtOH al 10 %. Las perlas se mezclan, se separan magnéticamente y el sobrenadante se separa por pipeta y se desecha. Este procedimiento de lavado se repite una vez más.

Se suspenden las perlas lavadas mediante la adición de 250 µl de MES 5 mM pH 6,1 y se mezcla. El antígeno DGP recombinante (preparado como se detalló anteriormente) se mezcla en el tampón de acoplamiento de perlas (solución salina tamponada que contiene detergentes) para obtener una concentración de recubrimiento de 5 µg/mg que se agrega a las perlas. Se incuba esta mezcla a temperatura ambiente durante 60 min con mezcla continua.

10 Se añaden al tubo 1000 µl de tampón de lavado posterior al recubrimiento (solución salina tamponada que contiene detergentes, cloruro de calcio y conservantes) y se mezcla. Se separan magnéticamente la perlas y el sobrenadante se separa por pipeta y se desecha. Este procedimiento de lavado se repite 3 veces más.

Bloqueo de perlas

15 Se añaden al tubo 1000 µl de tampón de bloqueo (solución salina tamponada que contiene detergentes, cloruro de calcio, conservantes y bloqueantes). Se incuba el tubo a 2-8 °C con mezcla. Se separan magnéticamente la perlas y el sobrenadante se separa por pipeta y se desecha al final de la incubación.

20 Se lavan las perlas con diluyente de partículas (solución salina tamponada que contiene detergentes, cloruro de calcio, conservantes y bloqueantes) mediante la adición al tubo de 1000 µl de diluyente de partículas. Se mezcla el tubo y se separan magnéticamente las perlas y el sobrenadante se separa por pipeta y se desecha. Este procedimiento de lavado se repite 3 veces más.

Se añaden 1000 µl de diluyente de partículas (100 µl/mg de partículas) en el tubo y se almacena a 2-8 °C en este tampón.

Ejemplo 3. Detección de la enfermedad celíaca utilizando el antígeno DGP recombinante

25 Este ejemplo proporciona un procedimiento que se utilizó para la detección de la enfermedad celíaca utilizando la proteína gliadina desaminada recombinante marcada con His clásica (SEQ ID NO: 7) como un antígeno.

Sumario del protocolo de inmunoensayo celíaco de IgA e IgG:

El instrumento, BioPlex 2200 (fabricado por Bio-Rad Laboratories) aspira 5 µl de muestra del tubo de muestra y la dispensa en un recipiente de reacción (RR) seguido por 45 µl de tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato que contiene detergente y conservantes).

30 Se añaden 100 µl de diluyente de muestra (solución salina tamponada que contiene detergente, conservantes y bloqueantes) al RR, seguido de 150 µl de tampón de lavado.

Se incuba el RR durante 130 s a 37 °C.

Se añaden al RR 100 µl del reactivo de partículas (una solución de perlas recubiertas con gliadina desamidada recombinante en diluyente de partículas). La dilución de muestra final es 1/80.

35 Se incuba la mezcla durante 1180 s a 37 °C con mezcla intermitente.

Se lavan las perlas 3 veces con 600 µl, luego 300 µl, luego 600 µl de tampón de lavado con separación magnética después de cada lavado.

Se añaden al RR 50 µl de reactivo conjugado (una mezcla de anti-IgA/IgG humana-ficoeritrina en diluyente conjugado (solución salina tamponada que contiene detergente, conservantes y bloqueantes)).

40 Se incuba la mezcla durante 600 segundos a 37 °C con mezcla intermitente.

Se lavan las perlas 3 veces con 600 µl, luego 300 µl, luego 600 µl de tampón de lavado con separación magnética después de cada lavado.

Se añaden al RR 50 µl de tampón de lavado para volver a suspender las perlas.

45 La suspensión de perlas se aspira en el módulo de detector Luminex (LDM, de sus siglas en inglés) y se mide la fluorescencia media de las partículas en cada una de las regiones de perlas especificadas. La Figura 2 muestra la titulación del recubrimiento del hexámero DGP clásico.

Sensibilidad en pruebas celiacas

La Tabla 1 muestra la cantidad de señal (intensidad de fluorescencia relativa, IFR) detectada para muestras normales y positivas celiacas a diferentes concentraciones del hexámero de DGP.

Tabla 1. IFR y Concentración de recubrimiento de DGP para DGP "clásica"

Concentración de recubrimiento de DGP, µg/mg	IFR de muestra sana normal		IFR de muestra positiva celiaca en el corte	
	IgA	IgG	IgA	IgG
0,0	21	14	20	15
2,0	46	71	750	1152
5,0	47	76	808	1235
10,0	49	81	831	1262
25,0	51	81	844	1273
40,0	50	80	842	1275

5 Análisis de muestras celiacas

El siguiente estudio de concordancia estuvo compuesto por 62 muestras de celiacos. La Tabla 2 muestra los resultados de la comparación del hexámero de DGP y el procedimiento predicado.

Tabla 2. Estudio de concordancia de 62 muestras de celiacos utilizando DGP "clásica"

Analito	Acuerdo con el procedimiento predicado (INOVA)		
	Acuerdo positivo	Acuerdo negativo	Acuerdo total
IgA	97 %	91 %	95 %
IgG	100 %	94 %	97 %

10 La intensidad de fluorescencia relativa (IFR) se midió para muestras de pacientes normales y celiacos utilizando un hexámero de DGP (Tabla 3). Se evaluó la inmunoreactividad del paciente mediante el índice de anticuerpos (IA) en el que la reactividad positiva es > 1,0.

Tabla 3. Datos de IFR e IA para muestras de pacientes normales y celiacos utilizando DGP "clásica"

IgA		
Muestra	IFR	IA
2320644	170	0,2
2324881	49	0,0
GA61882J	956,0	2,1
GA61882R	903,0	1,5
GA64089B	809,0	1,6
GA64089G	1111,0	2,3
GA64089O	1753,5	3,6
A-9355	42,0	0,0
15902,0	2030	4,5
16313	14928,0	20,1
13424	5724,0	8,1
13425	5816,0	8,2
IgG		
Muestra	IFR	IA
2320644	37,0	0
2324881	75,0	0
GG61791B	1287,0	1,2
GG61791J	1319,0	1,3

(continuación)

IgG		
Muestra	IFR	IA
GG66322P	204,0	0,2
GG66322R	3764,0	3,7
GG66322T	4847,0	4,2
A-9355	105,0	0,1
15902	5360,0	4,5
16313	10454,0	8,5
13424	4436,0	3,3
13425	2171,5	1,9

Ejemplo 4. Detección de la enfermedad celíaca utilizando el antígeno DGP recombinante con una lisina adicional

5 En este ejemplo, la proteína hexamérica D2 "que contiene lisina" (un péptido de gliadina desamidada recombinante marcada con His con una lisina sustituida por un resto de ácido glutámico en la posición 14 cerca de la región N-terminal) (SEQ ID NO: 8) se analizó para sensibilidad a la enfermedad celíaca.

La inmovilización de este antígeno en perlas magnéticas se realizó de la misma manera como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 3 muestra la titulación del recubrimiento del hexámero de DGP que contiene lisina.

10 Se realizó la detección de la enfermedad celíaca utilizando este antígeno mediante inmunoensayo de la misma manera que la descrita para la proteína hexamérica "clásica" en el Ejemplo 3.

Sensibilidad en pruebas celíacas

La Tabla 4 muestra la IFR para muestras normales y positivas celíacas a diferentes concentraciones del hexámero de DGP.

Tabla 4. IFR y Concentración de recubrimiento de DGP para DGP "que contiene lisina"

Concentración de recubrimiento de DGP, µg/mg	IFR de muestra sana normal		IFR de una muestra positiva celíaca en el corte	
	IgA	IgG	IgA	IgG
0,0	21	22	25	27
0,5	45	60	623	1003
2,0	49	61	762	1170
5,0	61	89	814	1279
15,0	65	98	850	1336
45,0	64	95	875	1355

15 Análisis de muestras celíacas

La Tabla 5 muestra la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) para muestras de pacientes normales y celíacos medida por un hexámero de DGP. Se evaluó la inmunoreactividad del paciente mediante el índice de anticuerpos (IA) en el que la reactividad positiva es > 1,0.

20 **Tabla 5. Datos de IFR e IA para muestras de pacientes normales y celíacos utilizando DGP "que contiene lisina"**

IgA		
Muestra	IFR	IA
2320644	165	0,2
2324881	55	0
GA61882J	942,0	2,1
GA61882R	814,0	1,5
GA64089B	749,5	1,6

(continuación)

IgA		
Muestra	IFR	IA
GA64089G	1042,0	2,2
GA64089O	1647,0	3,5
A-9355	45,0	0
15902,0	1920	4,5
16313	15549,0	23
13424	5407,0	8,2
13425	5587,5	8,4
IgG		
Muestra	IFR	IA
2320644	47,0	0
2324881	70,0	0
GG61791B	1216,5	1,2
GG61791J	1120,0	1,1
GG66322P	194,0	0,2
GG66322R	3476,0	3,6
GG66322T	4607,0	4,2
A-9355	153,5	0,1
15902	5541,0	4,6
16313	10723	8,7
13424	3993,0	3,2
13425	1990,0	1,8

Ejemplo 5. Estudios comparativos del trímero de DGP v. el hexámero de DGP

5 El siguiente estudio de concordancia que consta de 62 muestras de celíacos comparó el valor predictivo del hexámero de DGP con un antígeno de gliadina previamente descrito, una proteína de fusión recombinante del trímero D2 (descrita previamente en el documento US 2009/0311727). El hexámero de DGP mostró acuerdo positivo y acuerdo total mejorado frente al trímero de DGP (Tabla 6). Estos resultados demuestran la sensibilidad mejorada del hexámero de DGP en comparación con el trímero de DGP.

Tabla 6. Estudio de concordancia de comparación

Analito	Acuerdo con el procedimiento predicado (INOVA)		
	Acuerdo positivo	Acuerdo negativo	Acuerdo total
IgG-Trímero de DGP	84 %	94 %	89 %
IgG-Hexámero de DGP	100 %	94 %	97 %

10 El hexámero de DGP también mostró una especificidad sorprendentemente mejorada en comparación con el trímero de DGP, que produjo muchos resultados positivos falsos. Este problema se eliminó utilizando el hexámero de DGP. La Tabla 7 a continuación muestra datos de un cribado de 407 muestras normales. El trímero de DGP dio un 25 % de falsos positivos mientras que el hexámero de DGP dio solo un 0,5 % de falsos positivos. La especificidad para la detección de falsos positivos es ≤ 1 %.

Tabla 7. Análisis de muestras normales

	Trímero de DGP	Hexámero de DGP
Muestras totales	407	407
Falsos positivos	102	2

15 Las Figuras 4a y 4b muestran el rendimiento mejorado del hexámero de DGP en comparación con el trímero de DGP. En estos estudios, la concentración de recubrimiento de perlas del hexámero de DGP fue 5 veces menor que la del trímero de DGP, mientras que la señal de IFR de corte fue la misma. El hexámero de DGP recombinante tenía

ES 2 688 268 T3

sensibilidad mejorada en comparación con el trímero de DGP recombinante en los ensayos de IgA (Figura 4a) e IgG (Figura 4b).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bio-Rad Laboratories, Inc.
- 5 <120> Antígeno de la gliadina desamidada recombinante
<130> 71401-858799
<150> EP 12855209.8
<151> 03/12/2012
- 10 <150> US 61/567.060
<151> 05/12/2011
<160> 15
<170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 15 <210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> péptido D2 sintético de la proteína gliadina
<400> 1
- 20 Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe
 1 5 10 15
- <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> espaciador peptídico sintético, espaciador del polímero glicina-serina, enlazador **flexible**
<400> 2
- Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
- 30 <210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> hexámero de D2 sintético de la proteína gliadina recombinante
- 35 <400> 3

ES 2 688 268 T3

Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Pro	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu
			20					25					30		
Gln	Glu	Arg	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln
		35					40					45			
Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln
	50					55					60				

Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Pro	Phe	Gly
65					70					75					80
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Glu	Gln
				85					90					95	
Glu	Arg	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln
			100					105					110		
Ser	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Pro	Phe							
		115						120							

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> marcador His sintético

<400> 4

His His His His His His
 1 5

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> marcador His sintético

15

<400> 5

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Pro Glu Phe
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> marcador His sintético

<400> 6

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Pro Lys Phe
 1 5 10 15

25

<210> 7
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> hexámero de D2 "clásico" sintético con marcador His, proteína gliadina desamidada recombinante clásica marcada con His (DGP)

ES 2 688 268 T3

<400> 7

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Pro Glu Phe Gln
 1      5      10      15
Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly
      20      25      30

Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln
      35      40      45
Glu Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln
      50      55      60
Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
65      70      75      80
Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly Gly
      85      90      95
Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu
      100      105      110
Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser
      115      120      125
Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe
      130      135
    
```

<210> 8

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hexámero de D2 sintético "que contiene lisina" con marcador His, proteína gliadina desamidada recombinante marcada con His con sustitución de lisina en la posición 14

10 <400> 8

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Pro Lys Phe Gln
 1      5      10      15
Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly
      20      25      30
Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln
      35      40      45
Glu Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln
      50      55      60
Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
65      70      75      80
Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe Gly Gly
      85      90      95
Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu
      100      105      110
Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser
      115      120      125
Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe
      130      135
    
```

<210> 9

<211> 366

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hexámero de D2 sintético de la proteína gliadina recombinante

<400> 9

ES 2 688 268 T3

```

cagcccgaac aaccgcaaca atcattcccc gagcaagaaa ggccggttcgg tggcggtggc 60
tcgcagcccc aacaaccgca acaatcattc cccgagcaag aaaggccggt cgggtggcggt 120
ggctcgcagc ccgaacaacc gcaacaatca tcccccgagc aagaaaggcc ggggtggcggt 180
ggctcgggaat tccagcccga acaaccgcaa caatcattcc cccgagcaaga aaggccggttc 240
ggtggcggtg gctcgcagcc cgaacaaccg caacaatcat tccccgagca agaaaggccg 300
ttcgggtggc gtggctcgca gcccgaacaa ccgcaacaat cattccccga gcaagaaagg 360
ccgttc 366

```

<210> 10
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> proteína sintética glutatión S-transferasa (GST)

<400> 10

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1      5      10      15
Thr Arg Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
      20      25      30
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
      35      40      45
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50      55      60
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65      70      75      80
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
      85      90      95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
      100      105      110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
      115      120      125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
      130      135      140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
      145      150      155      160
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
      165      170      175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
      180      185      190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
      195      200      205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
      210      215      220

```

10 <210> 11
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> proteína de fusión gliadina sintética que incluye GST y el hexámero de D2 de gliadina desamidada recombinante

<400> 11

ES 2 688 268 T3

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1           5           10           15
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
          20           25           30
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
          35           40           45
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50           55           60
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65           70           75
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
          85           90           95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser

          100           105           110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
          115           120           125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130           135           140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145           150           155
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
          165           170           175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
          180           185           190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
          195           200           205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
210           215           220
Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe
225           230           235
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu
          245           250           255
Gln Glu Arg Pro Phe Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gln Pro Gln
          260           265           270
Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe
          275           280

```

<210> 12
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variantes sintéticas del péptido D2 de la proteína gliadina

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(13)
 <223> al menos un Glx es Gln y al menos un Glx es Glu

<400> 12

```

Glx Pro Glx Glx Pro Glx Glx Ser Phe Pro Glx Glx Glx Arg Pro Phe
 1           5           10           15

```

15 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> espaciador peptídico sintético, espaciador del polímero glicina-serina, enlazador flexible, repetido un número indefinido de veces, (GGGS)n

ES 2 688 268 T3

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

5
<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> espaciador peptídico sintético, espaciador del polímero glicina-serina, enlazador flexible, repetido un número indefinido de veces, (GSGGS)n

<400> 14

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

15
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> espaciador peptídico sintético, espaciador del polímero glicina-serina, enlazador flexible, repetido un número indefinido de veces, (GGGS)n

<400> 15

20
Gly Gly Gly Ser
1

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno para detectar la enfermedad celíaca que comprende una proteína gliadina desamidada recombinante o sintética que comprende un hexámero de péptidos, en el que cada péptido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El antígeno de la reivindicación 1, en el que el hexámero comprende un espaciador que separa cada péptido, preferentemente el espaciador tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.
3. El antígeno de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la proteína gliadina desamidada recombinante o sintética tiene al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3 o tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
4. El antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la gliadina desamidada recombinante o sintética está unida covalentemente a un marcador para formar una proteína de fusión de gliadina.
- 10 5. El antígeno de la reivindicación 4, en el que el marcador se selecciona de una glutatión S-transferasa (GST) o un marcador His, preferentemente
 - (i) el marcador es GST; o
 - (ii) el marcador His tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 15 6. El antígeno de la reivindicación 5, en el que la gliadina desamidada recombinante tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8.
7. El antígeno de la reivindicación 4, en el que el antígeno comprende además transglutaminasa tisular (tTG) para formar un complejo tTG-proteína de fusión de gliadina, preferentemente la tTG y la proteína de fusión de gliadina están unidas covalentemente mediante un reticulante.
- 20 8. El antígeno de la reivindicación 7, en el que el reticulante es un miembro seleccionado entre un reticulante heterobifuncional y un reticulante homobifuncional, preferentemente el reticulante es un reticulante homobifuncional, más preferentemente el reticulante se selecciona entre bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3), etilenglicol bis[succinimidilsuccinato] (EGS), etilenglicol bis[sulfosuccinimidilsuccinato] (sulfo-EGS), bis[2-(succinimidooxi-carboniloxi)etil]sulfona (BSOCOES), ditiobis(succinimidil)propionato (DSP), 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP), disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil glutarato (DSG), metil N-succinimidil adipato (MSA), disuccinimidil tartarato (DST), 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB), clorhidrato 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-piridilditio)-propionato) y sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato (sulfo-LC-SPDP), más preferentemente el reticulante es bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3).
- 25 9. Un ácido nucleico aislado que codifica el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o que comprende la SEQ ID NO: 9.
10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 9.
11. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10.
- 35 12. Un kit que comprende:
 - el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
 - un reactivo de detección; y
 - opcionalmente al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en tampones, sales, estabilizadores, e instrucciones.
- 40 13. Uso del antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para determinar si un sujeto tiene la enfermedad celíaca.
14. Un procedimiento para diagnosticar la enfermedad celíaca en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal del sujeto con el antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
 - 45 (b) detectar cualquier anticuerpo que se haya unido específicamente al antígeno, como una indicación de la presencia de la enfermedad celíaca en el sujeto.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que
 - (i) la muestra es una muestra de sangre;
 - (ii) la etapa de detección se realiza utilizando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, RIA y un ensayo de inmunofluorescencia; y/o
- 50

(iii) el anticuerpo específico para el antígeno se selecciona del grupo que consiste en IgG e IgA.

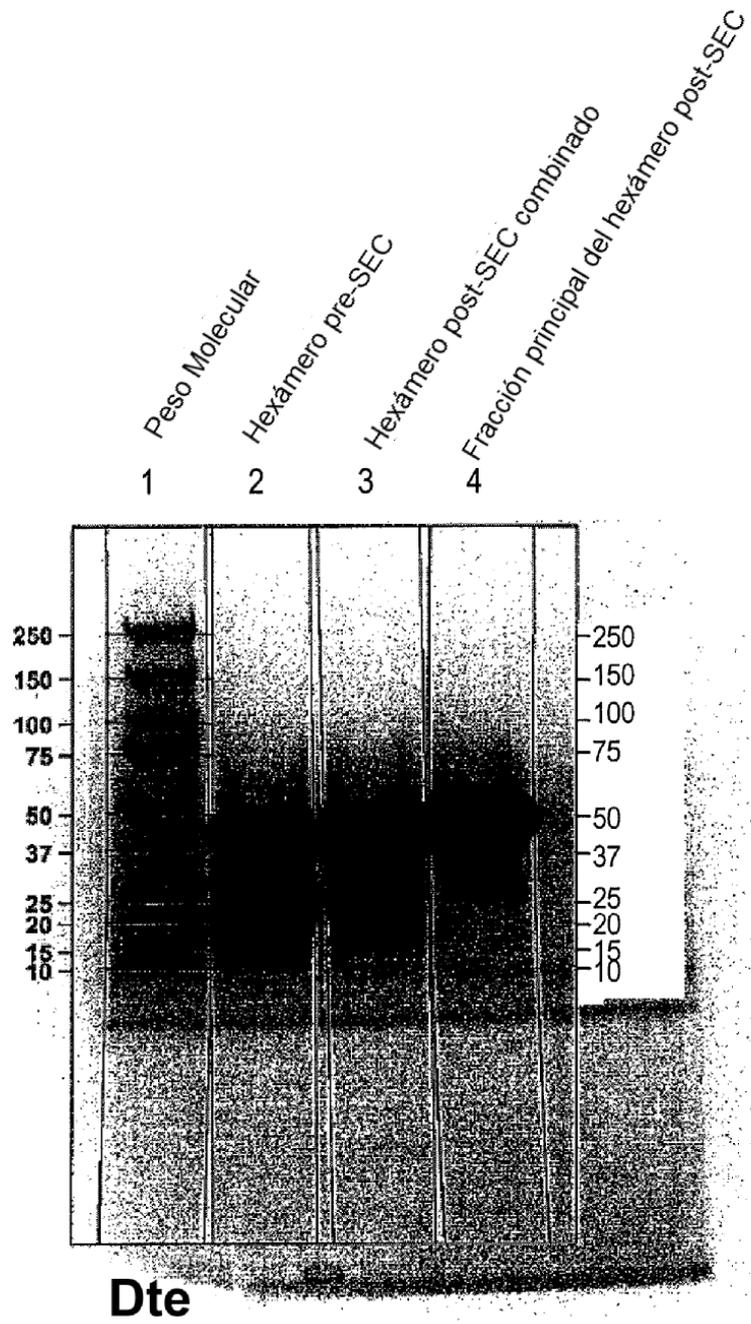


FIG. 1

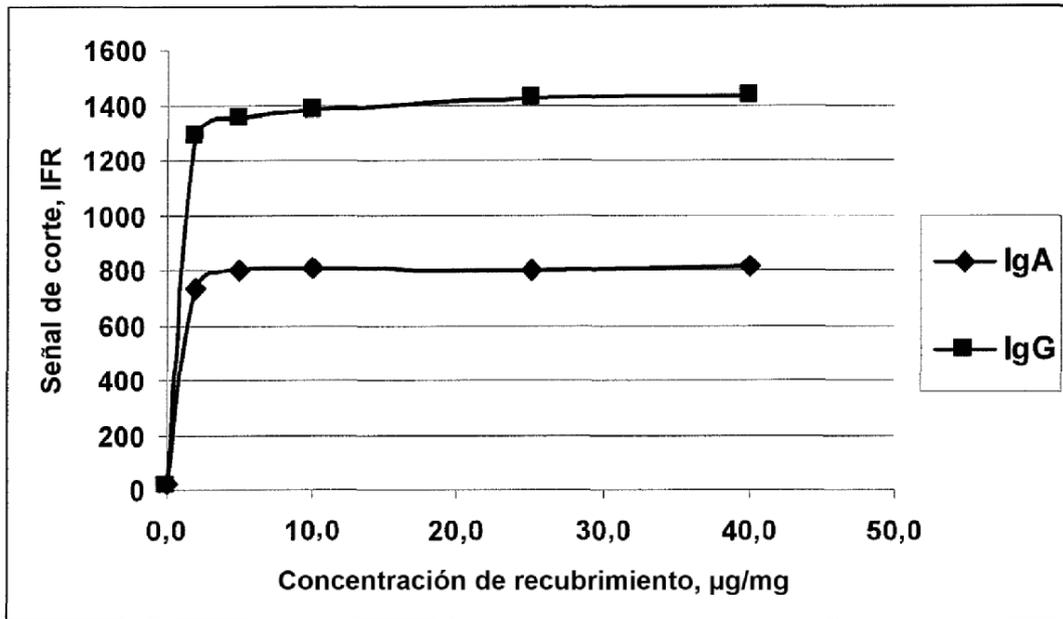


FIG. 2

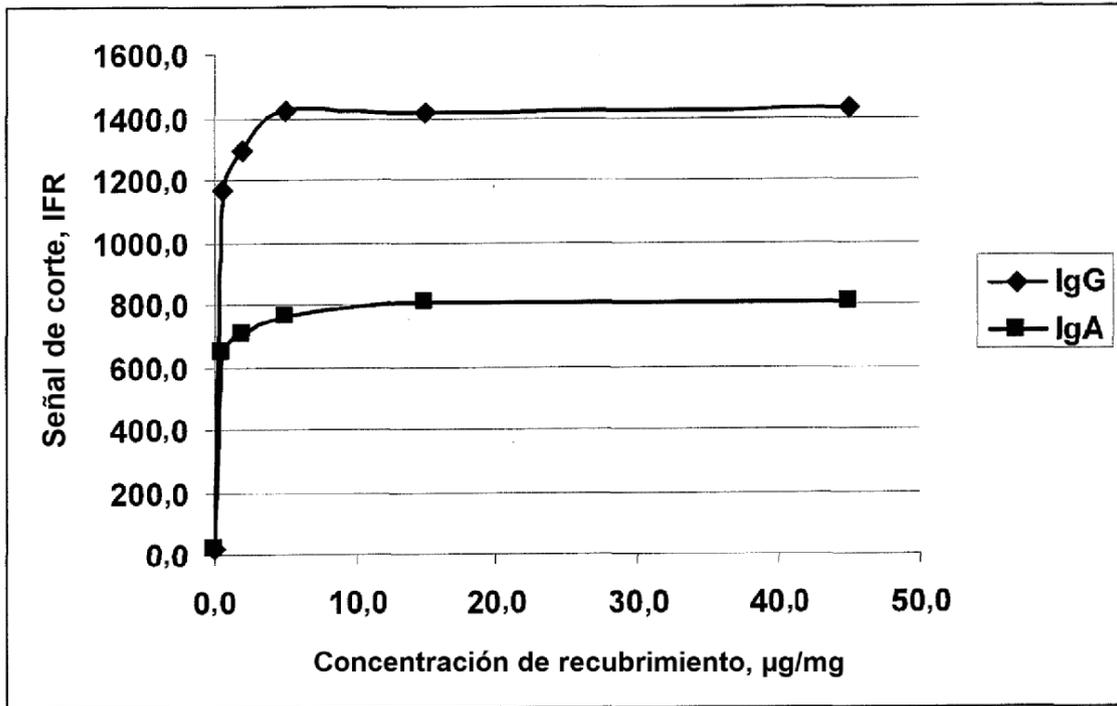
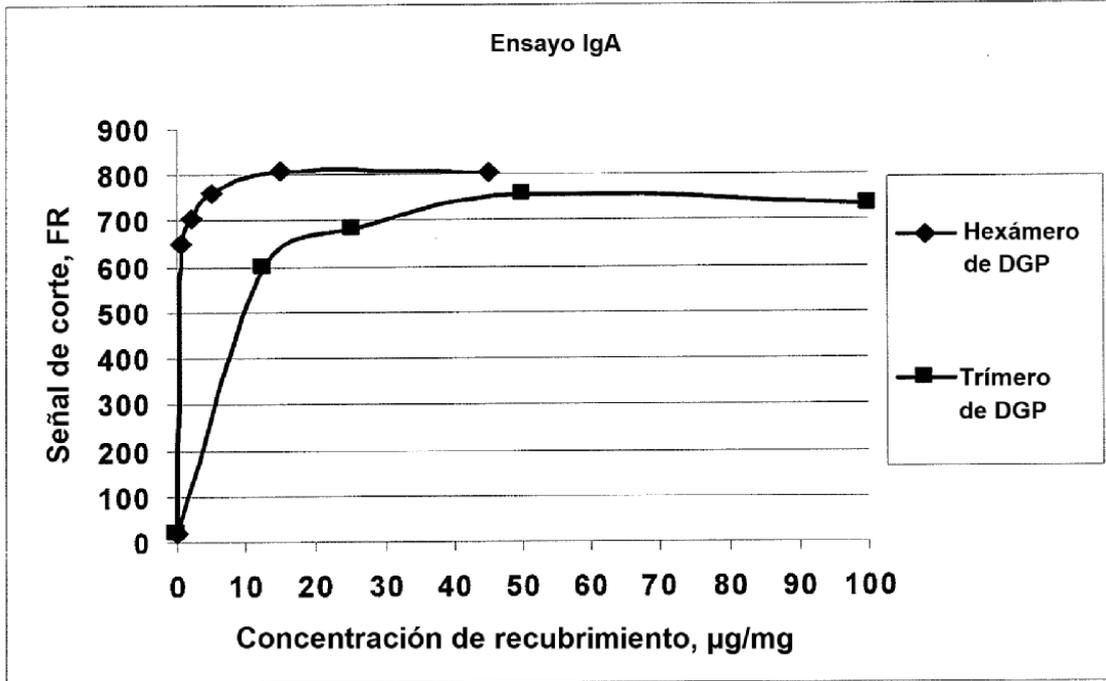


FIG. 3

A



B

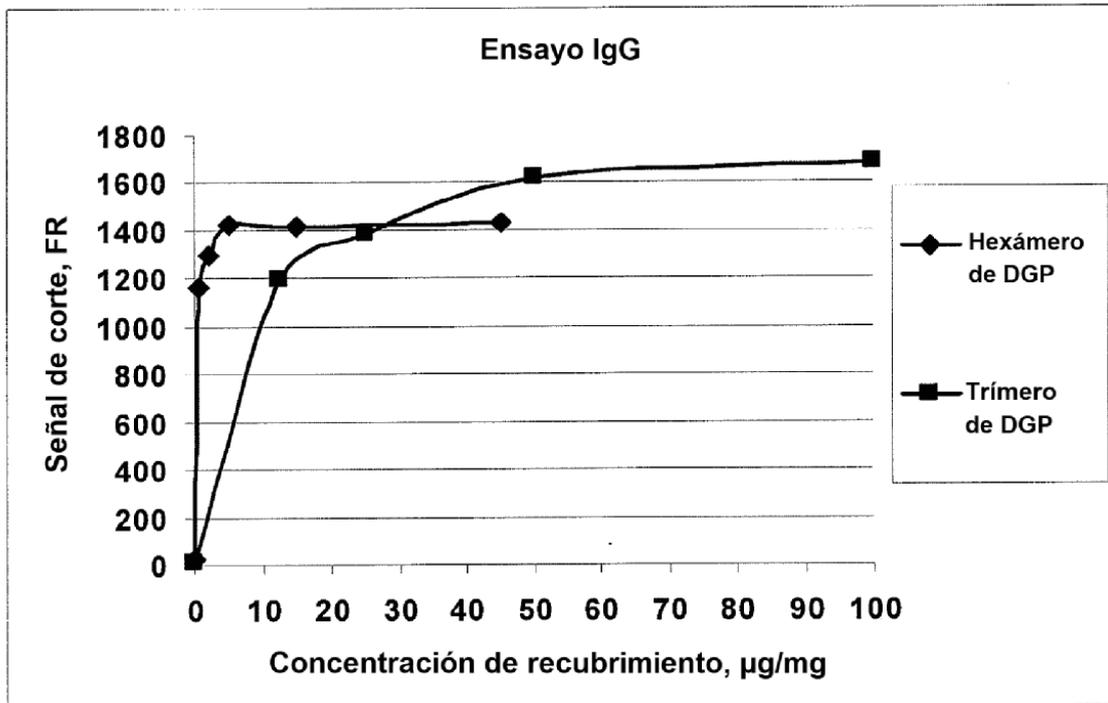


FIG. 4