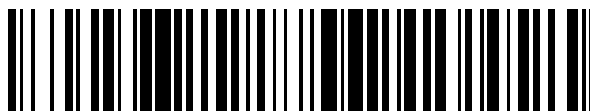


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 823**

51 Int. Cl.:

C07K 16/14 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015** **PCT/FI2015/050230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015** **WO15155412**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015** **E 15717533 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 3129403**

54 Título: **Anticuerpo contra el complejo de toxina HT-2-anticuerpo de toxina HT-2**

30 Prioridad:

07.04.2014 FI 20145330

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

17.04.2019

73 Titular/es:

**TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY
(100.0%)
Vuorimiehentie 3
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**AROLA, HENRI;
TULLILA, ANTTI y
NEVANEN, TARJA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 709 823 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

Anticuerpo contra el complejo de toxina HT-2-anticuerpo de toxina HT-2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inmunodiagnósticos. Especialmente, la invención se refiere a un inmunoensayo mejorado para detectar la presencia de toxina HT-2. En particular, la invención se refiere a una pareja de unión apta para reconocer un complejo inmunitario entre la toxina HT-2 y el anticuerpo anti-toxina HT-2. La invención se refiere asimismo a un kit de ensayo que comprende dicha pareja de unión para detectar la toxina HT-2. Además, la invención se refiere a un procedimiento y a un inmunoensayo en los que se utiliza dicha pareja de unión. Además, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica dicha pareja de unión y a una célula hospedadora apta para expresar dicha pareja de unión.

15 **Antecedentes**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de hongos y uno de los principales contaminantes de los productos agrícolas. La FAO ha estimado que las micotoxinas afectan a una cuarta parte de los cultivos alimentarios del mundo. No todos los factores que inducen la producción de micotoxinas son conocidos y, por lo tanto, dicha producción no es predecible.

Las micotoxinas son moléculas orgánicas pequeñas resistentes a diversos procedimientos de devastación. La contaminación de micotoxinas en alimentos, piensos y materias primas (tales como trigo, cebada, centeno y maíz) es un problema cada vez mayor en todo el mundo. Las micotoxinas también son perjudiciales para los microbios utilizados en procesos alimentarios. Se conocen más de 300 micotoxinas con diferentes modos de acción tóxicos para seres humanos y animales.

Las micotoxinas contaminan los alimentos y los piensos desde el campo hasta los productos de consumo. Se deben muestrear enormes cantidades de materia prima antes de aceptar su uso posterior. Las micotoxinas también causan enfermedades en los seres humanos y los animales que ingieren alimentos y piensos contaminados con micotoxinas. Las toxinas HT-2 y T-2 son metabolitos secundarios de los hongos *Fusarium spp* que contaminan cereales ya en los campos. Estas toxinas inhiben la síntesis tanto de ADN como de proteínas. Los tricotecenos HT-2 pueden causar, por ejemplo, hemorragia, vómitos, función inmunitaria alterada, fiebre y cefalea.

La Unión Europea, por ejemplo, ha establecido recomendaciones de límites máximos permisibles para aproximadamente diez micotoxinas o derivados de las mismas en materias primas y determinados productos. El muestreo, la preparación de la muestra y el análisis son de una importancia capital, dado que el hecho de no poder realizar un análisis verificado satisfactorio puede hacer que se acepten envíos inaceptables o que se rechacen innecesariamente cargamentos satisfactorios. Se ha informado de avances en procedimientos cromatográficos, cromatografía de líquidos y gases, integrada con espectrometría de masas (Li *et al.*, Revisión 2013). Estos procedimientos son sensibles y precisos, aunque es necesaria una preparación tediosa de la muestra. Además, se requieren equipos costosos y personal altamente cualificado que trabaje en entornos de laboratorio.

Se necesitan procedimientos rápidos y sencillos *in situ* adecuados para un formato de ensayo de alto rendimiento. Los inmunoensayos actuales para determinar la toxina HT-2 no son satisfactorios. Están basados en anticuerpos y son inmunoensayos competitivos que son sensibles a las moléculas de reacción cruzada presentes en una muestra. Cuando se utiliza un ensayo competitivo, la presencia de moléculas de reacción cruzada en la muestra proporciona una sobreestimación del analito real. Los ensayos ELISA competitivos cuantitativos requieren un procedimiento de varias etapas complejo con varias etapas de lavado.

En el inmunoensayo de tipo sándwich abierto solo se necesita un anticuerpo y la amplificación de la señal se obtiene por medio de una enzima conjugada (Ueda *et al.* 1996, Hara *et al.* 2013). Las etapas de recubrimiento, bloqueo, varias etapas de incubación y lavado, no obstante, precisan tanto tiempo como los ELISA de tipo sándwich convencionales. Los ensayos basados en un único anticuerpo son sensibles a otros analitos relacionados debido a la reactividad cruzada.

El ensayo de complejo inmunitario de fagos del que informaron Gonzales-Techera *et al.* (2007) tiene el potencial para el tipo de ensayo ELISA o la amplificación por PCR de la señal. Los fagos como tales no son cuerpos de detección preferidos en diagnósticos rápidos ni en el uso *in situ*.

La extinción de la fluorescencia intrínseca de anticuerpos debida a la unión de un analito pequeño se ha utilizado en un desarrollo de ensayo no competitivo para las micotoxinas aflatoxina, ocratoxina A y zearalona por Li *et al.* (2013). El procedimiento utiliza un anticuerpo cuya especificidad determina la especificidad del ensayo. La unión de moléculas de reacción cruzada puede inducir la extinción del agente fluorescente, así como del analito diana.

Otro enfoque utiliza el fenómeno FRET entre el anticuerpo y un analito pequeño unido (Li *et al.* 2011). Este procedimiento se puede aplicar a una cantidad limitada de moléculas orgánicas como analito diana.

Se utilizan ampliamente ensayos de flujo lateral sencillos en diversas áreas de aplicación debido a su facilidad de uso y su rápida respuesta, pero solo permiten resultados cualitativos o semicuantitativos (revisión de Dzantiev *et al.*, 2014). Vanrell *et al.* (2013) han desarrollado también un ensayo de flujo lateral de analito pequeño utilizando péptidos anti-complejo inmunitario insertados en el núcleo de estreptavidina/avidina.

El documento EP 1579222B1 divulga un inmunoensayo no competitivo para analizar analitos pequeños. El documento CN 102766208A divulga un anticuerpo monoclonal capaz de identificar toxinas T-2 y HT-2. También se divulga un procedimiento de enzimoimmunoensayo de adsorción y un kit para detectar toxinas T-2 y HT-2, y la aplicación del mismo a la detección de toxinas HT-2 y T-2.

Yanshen *et al.* (2014) divulgan la creación de un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-toxina T-2 específico que se une a la toxina T-2 con un valor de CR insignificante para la mayor parte de las micotoxinas, incluida la toxina HT-2. Se divulga, utilizando este anticuerpo específico, un procedimiento ELISA para la determinación de la toxina T-2.

Turner *et al.* (2009) describen micotoxinas, tales como ocratoxinas y aflatoxinas. Turner *et al.* describen que debido a la diversidad de estructuras de estas toxinas, es imposible utilizar una técnica estándar para el análisis y/o la detección y que los requisitos prácticos para el análisis de alta sensibilidad y la necesidad de un laboratorio especializado plantean dificultades para el análisis rutinario. Turner *et al.* también divulgan varias técnicas analíticas, que ofrecen procedimientos de análisis y, en algunos casos, de detección, flexibles y de amplia base.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un ensayo sencillo, rápido y fiable para someter a ensayo la toxina HT-2, que se pueda utilizar, por ejemplo, para el cribado de grandes cantidades de muestras.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques de diagnósticos rápidos para el cribado de la presencia de micotoxinas en modo de alto rendimiento a partir de abundantes cantidades de muestra.

La presente invención se refiere a un nuevo reactivo para la detección rápida y fiable de micotoxinas HT-2. El reactivo es capaz de reconocer un complejo inmunitario formado entre la toxina HT-2 y el anticuerpo anti-toxina HT-2. Especialmente, la presente invención se refiere a una pareja de unión que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo, en la que dichas regiones de cadena ligera tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y dichas regiones de cadena pesada tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente.

La invención se refiere asimismo a un kit de ensayo que comprende dicha pareja de unión y que comprende además otra pareja de unión que comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4, respectivamente.

La invención se refiere asimismo al uso de las parejas de unión para detectar toxina HT-2 en una muestra. Las parejas de unión son especialmente adecuadas para un inmunoensayo homogéneo no competitivo que se puede utilizar, por ejemplo, para analizar una gran cantidad de muestras.

Además, la invención proporciona un procedimiento para detectar un analito en una muestra, con el que se hace reaccionar la muestra con un par de reactivos que comprende una primera pareja de unión que se une específicamente al analito y una segunda pareja de unión que se une específicamente al complejo del analito y la primera pareja de unión, y determinar la unión de la segunda pareja de unión a dicho complejo, indicando así la presencia del analito en la muestra, en el que dicho analito es una toxina HT-2 y dicha primera pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID NO : 4, y dicha segunda pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65, y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente. Además, la invención proporciona un polinucleótido que codifica la pareja de unión, y una célula hospedadora capaz de expresar la pareja de unión. El polinucleótido es ADN.

Además, la invención proporciona la utilización de la pareja de unión para detectar un analito en una muestra de alimento o de pienso para animales, en una muestra tomada de un ser humano o un animal expuesto a una toxina HT-2, o en una muestra ambiental.

La presente descripción describe un inmunoensayo sencillo de una etapa para la toxina HT-2.

En las reivindicaciones dependientes se exponen unas formas de realización ventajosas de la invención. Otros objetos, detalles y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los dibujos, la descripción detallada y los ejemplos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1a representa la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de Fab HT2-10 (SEC ID NO: 1).

La figura 1b representa la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de Fab HT2-10 (SEC ID NO: 2).

La figura 2a representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Fab HT2-10 (SEC ID NO: 3). Las regiones CDR están subrayadas y marcadas en negrita. Se muestran las tres regiones de complementariedad LCDR1 (aminoácidos 24-34, según Kabat 24-34), LCDR2 (aminoácidos 50-56, según Kabat 50-56) y LCDR3 (aminoácidos 89-97, según Kabat 89-97) de cada cadena de inmunoglobulina.

La figura 2b representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab HT2-10 (SEC ID NO: 4). Las regiones CDR están subrayadas y marcadas en negrita. Se muestran las tres regiones de complementariedad HCDR1 (aminoácidos 31-36, según Kabat 31-35), HCDR2 (aminoácidos 51-66, según Kabat 50-65) y HCDR3 (aminoácidos 99-105, según Kabat 95-102) de cada cadena de inmunoglobulina.

La figura 3a representa la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera HT2-10 (H5) anti-IC (SEC ID NO: 5).

La figura 3b representa la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC (SEC ID NO: 6).

La figura 4a representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC (SEC ID NO: 7). Las regiones CDR están subrayadas y marcadas en negrita. Se muestran las tres regiones de complementariedad LCDR1 (aminoácidos 24-37, según Kabat 24-34), LCDR2 (aminoácidos 53-59, según Kabat 50-56) y LCDR3 (aminoácidos 92-102, según Kabat 89-97) de cada cadena de inmunoglobulina.

La figura 4b representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC (SEC ID NO: 8). Las regiones CDR están subrayadas y marcadas en negrita. Se muestran las tres regiones de complementariedad HCDR1 (aminoácidos 31-35, según Kabat 31-35), HCDR2 (aminoácidos 50-65, según Kabat 50-65) y HCDR3 (aminoácidos 99-107, según Kabat 95-102) de cada cadena de inmunoglobulina.

La figura 5 representa la secuencia de nucleótidos de la fusión AP del anticuerpo secundario scFv HT2-10 (H5)-AP anti-IC. Las regiones variables pesadas y ligeras están marcadas en negrita. La región variable pesada y la región variable ligera están conectadas con un enlazador. La fosfatasa alcalina se encuentra al final del fragmento de anticuerpo.

La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de la fusión AP del anticuerpo secundario scFv HT2-10 (H5)-AP anti-IC. Las regiones variables pesadas y ligeras están marcadas en negrita. La región variable pesada y la región variable ligera están conectadas con un enlazador. La fosfatasa alcalina se encuentra al final del fragmento de anticuerpo, seguida de una etiqueta de histidina.

La figura 7 representa la especificidad del ensayo de toxina HT-2. Se proporcionan los resultados de ensayo del ensayo FRET de la toxina HT-2 en PBS, fondo de toxina T-2, tiempo de ensayo de 5 min. El HT2-10 (H5) anti-complejo inmunitario se seleccionó a partir de la biblioteca virgen humana VTT. El anticuerpo primario HT-2 10 tiene una reactividad cruzada del 100% para las toxinas HT2 y T-2. El anticuerpo secundario anti-IC hace que el ensayo sea específico para HT-2.

La figura 8 representa la especificidad del ensayo de toxina HT-2 en un ensayo ELISA simple en PBS, 50 min, fondo de toxina T-2, promedio de 3 repeticiones.

La figura 9 representa el ensayo FRET de toxina HT-2 en PBS, tiempo de ensayo de 10 min, promedio de 6 repeticiones. Se presenta una curva estándar.

La figura 10 representa los resultados del ensayo FRET de toxina HT-2 en metanol al 10%/agua, promedio de 6 repeticiones, tiempo de ensayo de 10 min. Se presenta una curva estándar. Una situación en la que la toxina HT-2 está en MeOH al 70%/agua y se diluye 1:7.

La figura 11 representa los resultados del ensayo FRET de toxina HT-2. La reacción se llevó a cabo en PBS con reactivos de anticuerpos secos. La TR-FRET se midió después de 10 min. Promedio de 6 repeticiones.

La figura 12 representa el ensayo FRET de la toxina HT-2 de 10 min en metanol al 10%/agua, reactivos de anticuerpos secos, promedio de 6 repeticiones.

5 La figura 13 representa los resultados del ensayo de la curva estándar ELISA simple de toxina HT-2 en PBS con un promedio de 6 repeticiones, 60 min.

La figura 14 representa un ensayo ELISA simple en MeOH al 10%, 60 min, 6 repeticiones.

10 La figura 15 representa el ensayo de flujo lateral para toxina HT-2, en el que la muestra sin toxina no presenta fondo (izquierda), se obtiene una banda clara con la muestra de toxina HT-2 (medio) y no se observa ninguna banda con la muestra de toxina T-2 (derecha) .

Listado de secuencias

15 Secuencias primarias de anticuerpos HT2-10

SEC ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de Fab HT2-10

SEC ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de Fab HT2-10

SEC ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Fab HT2-10

20 SEC ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab HT2-10

Secuencias de anticuerpos secundarios anti-IC HT2-10 (H5)

25 SEC ID NO: 5: secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC

SEC ID NO: 6: secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC

SEC ID NO: 7: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC

30 SEC ID NO: 8: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC

SEC ID NO: 9: Secuencia de nucleótidos de fusión AP del anticuerpo secundario anti-IC scFv HT2-10 (H5)-AP

35 SEC ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de fusión AP del anticuerpo secundario anti-IC scFv HT2-10 (H5)-AP

Descripción detallada de la invención

40 La HT-2 y la T-2 son micotoxinas, que son metabolitos secundarios de hongos *Fusarium spp.* La HT-2 es una forma hidrolizada de la toxina T-2. Las toxinas HT-2 y T-2 se encuentran en la avena, la cebada, el trigo, el centeno, el maíz, el arroz y en productos producidos a partir de los mismos, tales como fideos, cerveza y alimentos para bebés basados en cereales.

45 Las micotoxinas HT-2 y T-2 pertenecen a las micotoxinas tricoteceno, que presentan varios problemas relacionados con la salud: los tricotecenos causan hemorragia, vómitos, alteración de la función inmunitaria, fiebre, cefalea e incluso la muerte.

50 La presente invención se refiere a un ensayo rápido y sencillo para el análisis de micotoxinas. Especialmente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para la detección de toxina HT-2. El análisis de una sola etapa rápido y fiable es adecuado para analitos pequeños. El ensayo de tipo sándwich para analitos pequeños proporciona unas mejores especificidad y sensibilidad. Se lleva a cabo el desarrollo de anticuerpos anti-complejo inmunitario.

55 Algunas ventajas de la presente invención son una mejora en la especificidad del inmunoensayo de la toxina HT-2 y una simplificación significativa del procedimiento de ensayo en comparación con los ensayos actuales. Esto reduce la cantidad de trabajo y por lo tanto el tiempo necesario.

60 El inmunoensayo de la presente invención es rápido y puede aplicarse a ensayos de alto rendimiento para un gran número de muestras. La presente invención mejora la especificidad del ensayo.

65 El par de reactivos para el inmunoensayo no competitivo de la invención comprende una primera pareja de unión y una segunda pareja de unión. La primera pareja de unión se une al analito para formar un complejo entre la primera pareja de unión y el analito. La segunda pareja de unión se une al complejo formado por la primera pareja de unión y el analito. Las parejas de unión son generalmente proteínas tales como anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos que tienen las propiedades de unión deseadas.

Una "pareja de unión", tal como se usa en la presente memoria, es generalmente una proteína o un polipéptido, tal como anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos que tienen las propiedades de unión deseadas. Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina y puede pertenecer a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgE, IgA o IgD, siendo IgG e IgM las utilizadas más frecuentemente. Preferentemente, las parejas de unión son fragmentos de anticuerpo que comprenden el sitio de unión al ligando, tales como fragmentos Fab o scFv. El fragmento conocido como el fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) consiste en el dominio variable y constante de una cadena ligera de inmunoglobulina unido covalentemente por un puente disulfuro al dominio variable y el primer dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Fv (dominio variable) significa las regiones variables de la molécula de inmunoglobulina que son responsables de la unión al ligando. scFv (Fv monocatenario) significa una molécula en la que los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo están unidos por un péptido formando una sola cadena polipeptídica sintetizada a partir de una única molécula de ARNm. Las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina son responsables conjuntamente de la unión al ligando. El ligando es la sustancia a la que se une la pareja de unión, con respecto a anticuerpos es un antígeno o un hapteno.

La primera pareja de unión de la presente invención comprende las CDR1-3 de la cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de la cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66, y 99-105 de la SEC ID n°: 4. La primera pareja de unión Fab anti-HT2 (10) también se divulga en la presente descripción con denominaciones tales como anticuerpo primario HT2-10, anticuerpo anti-toxina HT-2, anticuerpo primario HT2-10, Fab HT2-10, Fab anti-toxina HT2, anticuerpo primario Fab HT2-10 y Fab anti-HT2/T2 (10).

La segunda pareja de unión de la presente invención comprende las CDR1-3 de la cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y las CDR1-3 de la cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65, y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente. La segunda pareja de unión Fab HT2 (H5) anti-IC también se divulga en la presente descripción con denominaciones tales como HT2-10 (H5) anti-IC, anticuerpo secundario HT2-10 (H5) anti-IC, HT2-10 (H5) anti-complejo inmunitario, anticuerpo secundario anti-IC, HT2-10 (H5) anti-IC, anticuerpo secundario H5, anticuerpo H5 anti-complejo inmunitario y Fab HT2 (H5) anti-IC.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable". Los residuos de "región estructural" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable tal como se define en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "dominio variable de cadena pesada", "dominio V_H" y/o "V_H" se usan indistintamente y se refieren a la región hipervariable (que abarca los dominios CDR y estructurales) de la cadena pesada de un anticuerpo; los términos "dominio variable de cadena ligera", "dominio V_L" y/o "V_L" se usan indistintamente y se refieren a la región hipervariable (que abarca los dominios CDR y estructurales) de la cadena pesada de un anticuerpo.

En la presente invención, la primera pareja de unión, es decir, el anticuerpo primario HT2-10 comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4, respectivamente.

En la presente invención, la segunda pareja de unión, es decir, el anticuerpo secundario HT2-10 anti-IC comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y CDR1-3 de pesada cadena que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente.

Las primeras y segundas parejas de unión pueden formar fragmentos de anticuerpos Fab, scFv y anticuerpos monoclonales recombinantes.

La biblioteca de parejas de unión recombinantes es convenientemente una biblioteca de expresión, que es típicamente una biblioteca de presentación. El principio general de las bibliotecas de parejas de unión recombinantes de presentación es que presentan la pareja de unión como una proteína de fusión en la superficie, que puede ser la superficie de una célula microbiana tal como una célula bacteriana o de levadura, o un bacteriófago. La biblioteca de parejas de unión recombinantes de presentación también puede ser una biblioteca de presentación, en la que se producen complejos estables de proteínas emergentes y ARNm en un sistema de expresión in vitro. Las bibliotecas de presentación en fagos son las utilizadas más frecuentemente.

La primera pareja de unión puede ser un anticuerpo monoclonal convencional o un fragmento del mismo, pero preferentemente es uno recombinante, como lo es la segunda pareja de unión.

La pareja de unión de la invención se puede utilizar en un ensayo de tipo sándwich para detectar la toxina HT-2 en una muestra, con el que la muestra se hace reaccionar con un par de reactivos que comprende una primera pareja de unión que se une específicamente a la toxina HT-2 y una segunda pareja de unión, que es capaz de reconocer específicamente un complejo inmunitario entre la toxina HT-2 y el anticuerpo anti-toxina HT-2, y que es la pareja de unión de la invención. La unión de la segunda pareja de unión al complejo inmunitario entre la primera pareja de unión y la toxina HT-2 indica la presencia de toxina HT-2 en la muestra.

Las parejas de unión se preparan convenientemente utilizando una biblioteca de parejas de unión de presentación en fagos recombinantes, por ejemplo tal como se describe en el documento WO 2004/046733. Cuando se ha seleccionado la primera pareja de unión, se compleja con su ligando y este complejo se utiliza para seleccionar la segunda pareja de unión a partir de una biblioteca de anticuerpos recombinantes. La primera pareja de unión sin el ligando se utiliza como contraselección. La segunda pareja de unión deberá reconocer los complejos, no la primera pareja de unión libre ni el antígeno libre en una medida significativa.

Se puede construir una biblioteca de anticuerpos de presentación en fagos mediante la clonación de dominios de inmunoglobulina que codifican los ADNc en un vector de presentación en fagos apropiado.

El ADN que codifica millones de variantes de fragmentos de anticuerpos se clona por lotes en el vector como parte de la proteína de la cubierta del fago. Se pueden obtener bibliotecas grandes que contienen millones de fragmentos de anticuerpos con diferentes especificidades transformando los vectores en bacterias. El cultivo de las bacterias conduce a la expresión de fagos que muestran fragmentos de anticuerpos en su superficie. El gen del anticuerpo presentado se porta en el plásmido fagémido empaquetado dentro del fago, vinculando así el genotipo con el fenotipo. El enlace físico entre la proteína presentada y su ADN permite el cribado de un vasto número de variantes de la proteína, cada una asociada a su ADN correspondiente, mediante un procedimiento de selección *in vitro* sencillo denominado cribado.

En su forma más sencilla, el cribado se lleva a cabo incubando el conjunto de fagos que presentan variantes con el ligando de interés que se ha inmovilizado en un soporte, eliminando por lavado el fago no unido y eluyendo el fago unido específicamente mediante la rotura de su unión al ligando. El fago eluido, a continuación, se amplifica *in vivo*.

El proceso se repite varias veces, lo que da como resultado un enriquecimiento gradual del conjunto de fagos a favor de las secuencias con la unión más estrecha. Después de aproximadamente 3 a 6 rondas de selección y amplificación, los mejores clones se secuencian y se transforman en una célula hospedadora para su expresión posterior. La célula hospedadora puede ser una célula eucariótica o procariótica, por ejemplo una célula de levadura, animal, vegetal o de insecto o una célula bacteriana. Puede ser incluso una célula de mamífero, que después de la transformación produce un anticuerpo monoclonal recombinante. La pareja de unión recombinante o al menos parte del mismo también puede producirse sintéticamente.

La presente invención se refiere a nuevas parejas de unión específicas de micotoxinas. Más particularmente, la invención se refiere a anticuerpos recombinantes específicos de micotoxinas. Los beneficios de los anticuerpos recombinantes incluyen un tamaño reducido, una inmovilización eficaz y una producción bacteriana barata. Las bibliotecas de anticuerpos permiten una selección rápida *in vitro* de nuevos anticuerpos. Se efectúa la utilización de antígenos para provocación. Las bibliotecas de anticuerpos contienen $\sim 10^6$ clones diferentes.

La selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un procesador automatizado de perlas magnéticas. Se pueden utilizar diversos procedimientos de selección diferentes para seleccionar anticuerpos específicos. Se criban clones de anticuerpos recombinantes individuales, por ejemplo, mediante una estación robótica de alto rendimiento. Se pueden cribar miles de clones por día. La caracterización preliminar de los anticuerpos candidatos se lleva a cabo, por ejemplo, mediante ELISA y comparación de secuencias.

Un subconjunto de cepas que contienen anticuerpos se ha depositado según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes, 1977, en la VTT Culture Collection, dirección de oficina postal 1000, FI-02044 VTT, FINLANDIA (<http://culturecollection.vtt.fi>), con los códigos siguientes (número E):

HT2-10 Fab/pKKtac/RV308; E-143342
Anti-IC HT-10 (H5) Fab/pjExpress401/RV308; E-143343

El par de reactivos que comprende una primera pareja de unión que reconoce las toxinas HT-2 y T-2 y una segunda pareja de unión que reconoce un complejo inmunitario entre la toxina HT-2 y dicha primera pareja de unión posibilita un ensayo de tipo sándwich no competitivo para la toxina HT-2. El sándwich puede detectarse

mediante todos los procedimientos estándar de inmunoensayo. Una pareja puede inmovilizarse sobre un soporte, tal como un pocillo de microvaloración, un sistema μ -fluidic, una tira o una perla. Se forma un sándwich en presencia del analito y la otra pareja de unión. El sándwich puede detectarse, por ejemplo, utilizando anticuerpos secundarios o marcando por lo menos una de las parejas de unión.

5 La marca puede ser cualquier marca convencional, tal como una marca radioactiva, una enzima, una secuencia de nucleótidos o un compuesto fluorescente. El ensayo puede ser, por ejemplo, ELISA, immunoPCR o FIA.

10 El modo de detección puede ser colorimétrico, fluorescente (ya sea FRET o fluorescente de superficie), paramagnético, electroquímico o sin marca (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial y microbalanza de cristal de cuarzo). También se pueden aplicar otros tipos de ensayos, tales como el ensayo de aglutinación, el ensayo de flujo lateral, electroforesis capilar, matrices de anticuerpos, micropalanca y sistemas de ensayo de microfluidos.

15 Una gran ventaja de un par de reactivos que comprende la pareja de unión de la presente invención es que permite un inmunoensayo homogéneo, es decir, un inmunoensayo que se lleva a cabo en solución. Al evitar las etapas de inmovilización y lavado se hace el ensayo extremadamente sencillo. El ensayo homogéneo proporciona una herramienta excelente y conveniente para ensayos *in situ*, por ejemplo, para su utilización por la aduana para inspeccionar materias primas exportadas, bienes, etc. La muestra que se va a analizar puede ser cualquier muestra de alimento, muestra de pienso, muestra de materia prima de alimento, muestra de materia prima de pienso o una muestra procedente de un ser humano o un animal que ha consumido alimentos o piensos contaminados con toxina HT-2. La muestra puede proceder, por ejemplo, de avena, cebada, trigo, centeno, maíz, arroz y productos fabricados a partir de los mismos, tales como fideos, cerveza y alimentos para bebés basados en cereales.

25 Un inmunoensayo homogéneo preferido es uno basado en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). En la FRET, la energía de un fluoróforo molecular (donante) se excita a un estado de alta energía y se transfiere a otro fluoróforo (aceptor) mediante un acoplamiento dipolo-dipolo intermolecular. Esto es posible solo si la distancia entre el donante y el aceptor es corta (1-10 nm) y el espectro de fluorescencia del donante y el espectro de absorción del aceptor se superponen parcialmente. La transferencia de energía se detecta entonces como un cambio en la fluorescencia. A menudo se utiliza fluorescencia resuelta en el tiempo (Hemmilä I. *et al.*, 1988, Clin. Chem. 34: 2320-2322).

30 La FRET se puede aplicar a la presente invención marcando las dos parejas de unión, que preferentemente son fragmentos de anticuerpos, con fluoróforos que forman un par donante-aceptor de FRET. Cuando las parejas de unión y el analito son pequeños, los fluoróforos se acercan mucho y se obtiene una señal de FRET medible.

35 Como alternativa, el inmunoensayo para su uso con la toxina HT-2 puede ser, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich convencional en pocillos de microvaloración o un ensayo de flujo lateral.

40 La pareja de unión de la invención puede estar incluida en un kit de ensayo, que puede contener además cualesquiera otros reactivos necesarios para el ensayo junto con las instrucciones de uso. Preferentemente, el kit de ensayo contiene también una primera pareja de unión para su unión al analito. De forma más preferida, dicha pareja de unión comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo, en el que dichas regiones de cadena ligera tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, y dichas regiones de cadena pesada tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4. Preferentemente, el kit de ensayo comprende reactivos para llevar a cabo un ensayo homogéneo no competitivo tal como, por ejemplo, reactivos necesarios para un ensayo TR-FRET. El kit puede comprender además soluciones de reacción, tampones, soluciones de lavado y medios de detección, tales como marcas y, opcionalmente, un fluorómetro.

45 La realización del ensayo puede llevarse a cabo disponiendo los reactivos en el pocillo de una placa de microvaloración y añadiendo series de dilución de la muestra. En un modo preferido, por ejemplo para su utilización en el campo, los reactivos se encuentran en forma seca en un recipiente.

Se añade la muestra, que disuelve los reactivos, y el resultado se puede leer sin procesos adicionales.

50 En ese caso, el kit de ensayo puede comprender múltiples pares de reactivos físicamente separados entre sí, por ejemplo en forma de una micromatriz, por lo que se pueden analizar múltiples analitos simultáneamente a partir a partir de una muestra. La presente invención puede aplicarse a ensayos de alto rendimiento para un gran número de muestras.

55 La pareja de unión de la invención comprende tres CDR de una cadena ligera de anticuerpo que tiene las secuencias expuestas en la SEC ID n°: 7, y tres CDR de una cadena pesada de anticuerpo que tiene las secuencias expuestas en la SEC ID n°: 8. Según una forma de realización de la invención, la pareja de unión

comprende la región variable completa, es decir, la porción de unión al ligando de dicha cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH). Por lo tanto, puede contener los aminoácidos 1-107 de la SEC ID n°: 7 y los aminoácidos 1-118 de la SEC ID n°: 8. En particular, dicha pareja de unión comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 7 y la SEC ID n°: 8. Correspondientemente, la primera pareja de unión puede comprender la región variable completa de la SEC ID n°: 3 y la SEC ID n°: 4, es decir, los aminoácidos 1-107 de la SEC ID n°: 3 y los aminoácidos 1-116 de la SEC ID n°: 4. Especialmente comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 3 y la SEC ID n°: 4.

El desarrollo de anticuerpos de complejos inmunitarios es difícil. La presente invención proporciona por primera vez un anticuerpo de complejo inmunitario para HT-2. La segunda pareja de unión que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con regiones de cadena ligera que tienen los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7 y regiones de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8 de la presente invención son específicos para HT-2. La primera pareja de unión comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen las secuencias de aminoácidos de los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, y dichas regiones de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos de aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4.

La presente invención se puede aplicar en el diagnóstico rápido de la toxina HT-2 en alimentos, piensos y materiales relacionados con alimentos y piensos. Otras áreas de aplicación incluyen, por ejemplo, el diagnóstico de la exposición de seres humanos y animales a la toxina HT-2, o su utilización como herramienta de investigación.

Según la recomendación de la UE 2013/165/EU:

En caso de utilizar una técnica de cribado analítica, el límite de detección preferentemente no debe ser superior a 25 µg/kg para la suma de toxinas T-2 y HT-2, de forma más preferida no superior a 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 µg/kg para la suma de toxinas T-2 y HT-2.

El uso de materias primas requiere etapas de tratamiento previo y los tratamientos pueden variar según el material.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en sensores basados en inmunoensayos. Un experto en la materia puede seleccionar los sensores adecuados para su utilización.

Las variaciones o modificaciones secundarias de cualquiera de las secuencias o subsecuencias expuestas en la descripción y las reivindicaciones se encuentran aún dentro del alcance de la invención siempre que no afecten a la actividad de unión de las proteínas.

En la forma de realización 1, la presente invención proporciona una pareja de unión que comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente.

En la forma de realización 2 se proporciona la pareja de unión según la forma de realización 1, en la que la pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En la forma de realización 3, se proporciona la pareja de unión según la forma de realización 1 o 2, en la que la pareja de unión forma un fragmento de anticuerpo Fab, scFv, o un anticuerpo monoclonal recombinante.

La pareja de unión según la forma de realización 1 o 2 puede comprender un anticuerpo purificado que comprende las CDR1-3 de cadena ligera y las CDR1-3 de cadena pesada.

En la forma de realización 4 se proporciona la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 o 3, en la que la pareja de unión comprende secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 7 y la SEC ID n°: 8.

Según una forma de realización de la descripción, la pareja de unión comprende la región variable completa, es decir, la porción de unión al ligando de dicha cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH). Por lo tanto, puede contener los aminoácidos 1-107 de la SEC ID n°: 7 y los aminoácidos 1-118 de la SEC ID n°: 8. En particular, dicha pareja de unión comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 7 y la SEC ID n°: 8.

En la forma de realización 5 se proporciona la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 4, que reconoce específicamente un complejo inmunitario entre toxina HT-2 y antitoxina HT-2.

En la forma de realización 6, se proporciona un kit de ensayo que comprende la pareja de unión según

cualquiera de las formas de realización 1 a 5.

En la forma de realización 7, se proporciona el kit de ensayo según la forma de realización 6, que comprende además otra pareja de unión que comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4, respectivamente.

En la forma de realización 8 se proporciona el kit de ensayo según la forma de realización 7, en el que dicha otra pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En una forma de realización, otra pareja de unión puede comprender la región variable completa de la SEC ID n°: 3 y la SEC ID n°: 4, es decir, los aminoácidos 1-107 de la SEC ID n°: 3 y los aminoácidos 1-116 de la SEC ID n°: 4. Especialmente, comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID n°: 3 y la SEC ID n°: 4.

En la forma de realización 9 se proporciona el kit de ensayo según la forma de realización 7 a 8, en el que dicha otra pareja de unión forma un fragmento de anticuerpo Fab, scFv, o un anticuerpo monoclonal recombinante.

En la forma de realización 10 se proporciona el kit de ensayo según cualquiera de las formas de realización 7 a 9, en el que dicha otra pareja de unión reconoce específicamente la toxina HT-2, o tanto la toxina HT-2 como la toxina T-2.

En la forma de realización 11 se proporciona el kit de ensayo según cualquiera de las formas de realización 7 a 10, que comprende reactivos para un inmunoensayo homogéneo no competitivo.

En la forma de realización 12, se proporciona el kit de ensayo según cualquiera de las formas de realización 7 a 11, que comprende reactivos para el ensayo de transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET).

En la forma de realización 13 se proporciona un polinucleótido que codifica la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5.

Un polinucleótido puede ser ADN que comprende ADNc que codifica un polipéptido que comprende la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5.

En la forma de realización 14 se proporciona un polinucleótido que codifica dicha otra pareja de unión mencionado en una cualquiera de las formas de realización 7 a 12.

En la forma de realización 15 se proporciona una célula hospedadora aislada que se ha transformado con un polinucleótido que codifica la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5 y que es capaz de expresar la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5.

En la forma de realización 16 se proporciona una célula hospedadora aislada que se ha transformado con un polinucleótido según la forma de realización 15.

En la forma de realización 17 se proporciona el uso de la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5 para detectar un analito en una muestra de alimento o pienso para animales.

En la forma de realización 18 se proporciona el uso de la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5 para detectar un analito en una muestra tomada de un ser humano o un animal expuesto a una toxina HT-2.

En la forma de realización 19, se proporciona el uso de la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para detectar un analito en una muestra ambiental.

En la forma de realización 20 se proporciona un procedimiento para detectar toxina HT-2 en una muestra, que comprende

- hacer reaccionar la muestra con un par de reactivos que comprende una primera pareja de unión que se une a una toxina HT-2 o una toxina T-2 presente en la muestra para formar un complejo, y una segunda pareja de unión que se une específicamente a dicho complejo; y
- determinar la unión de la segunda pareja de unión al complejo, indicando así la presencia de la toxina HT-2 en la muestra,

en el que dicha pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51- 66, y 99-105 de la SEC ID n°: 4, respectivamente, y

dicha segunda pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente.

En la forma de realización 21 se proporciona el procedimiento según la forma de realización 20, en el que la presencia de toxina HT-2 se determina utilizando un inmunoensayo.

En la forma de realización 22 se proporciona el procedimiento según la forma de realización 21, en el que el inmunoensayo es un inmunoensayo homogéneo no competitivo.

En la forma de realización 23, se proporciona el procedimiento según la forma de realización 22, en el que el inmunoensayo homogéneo no competitivo es un ensayo de transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET).

En la forma de realización 24, se proporciona el procedimiento según cualquiera de las formas de realización 20 a 23, en el que dicho inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en un radioinmunoensayo, un ensayo de adsorción, un ensayo de flujo lateral, un ensayo de aglutinación de partículas, un ensayo de tipo sándwich , un ensayo de micromatriz de proteínas, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo de captura de antígeno, un inmunoensayo de fluorescencia y un inmunoensayo luminiscente.

En la forma de realización 25, se proporciona el procedimiento según cualquiera de las formas de realización 21 a 24, en el que dicho inmunoensayo está en un formato de ensayo directo.

En la forma de realización 26 se proporciona el procedimiento según cualquiera de las formas de realización 20 a 25, en el que la muestra se selecciona del grupo de una muestra de alimento, una muestra de pienso, una muestra de materia prima de alimento, una muestra de materia prima de pienso, una muestra ambiental y una muestra procedente de un ser humano o de un animal o de un microbio.

En la forma de realización 27 se proporciona el procedimiento según cualquiera de las formas de realización 21 a 26, en el que el inmunoensayo se utiliza en un sensor.

En la forma de realización 28 se proporciona el uso de la pareja de unión según cualquiera de las formas de realización 1 a 5 en un sensor.

En la forma de realización 29 se proporciona un clon de anticuerpo, que comprende un anticuerpo según la forma de realización 2 y está depositado en la VTT Culture Collection con el número de acceso VTT E-143343.

En la forma de realización 30 se proporciona un clon de anticuerpo, que comprende un anticuerpo según la forma de realización 8 y está depositado en la VTT Culture Collection con el número de acceso VTT E-143342.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de la biblioteca de genes de anticuerpos.

Los ratones se inmunizaron con el conjugado de toxina HT-2 (Sigma Aldrich) - proteína azul (Thermo Fisher Scientific) proporcionado por Verifin (Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention (Instituto Finlandés para la Verificación de la Convención de Armas Químicas)) en coadyuvante de Freund. El ratón que mostró la mejor respuesta inmunitaria se seleccionó para ser la fuente para la construcción de la biblioteca de genes de anticuerpos presentada en bacteriófagos.

La homogeneización del bazo del ratón se realizó utilizando un homogeneizador Kinematica AG Polytron PT 1200 esterilizado. El ARN total se extrajo de bazo homogeneizado utilizando un kit comercial Qiagen RNeasy® Midi/Maxi según las instrucciones del fabricante. Además, la digestión con DNasa en columna se llevó a cabo utilizando un conjunto de DNasa exento de RNasa (Qiagen).

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de la plantilla totRNA utilizando el kit Phusion® RT-PCR (Finnzymes) con cebado oligo-dT.

La cadena ligera y la cadena pesada de IgG de ratón se clonaron por separado a partir de la plantilla de ADNc. Tanto los dominios variables ligeros como los pesados se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores específicos para cadenas variables pesadas y ligeras y regiones constantes. Las secuencias del cebador eran tal como se describen en el documento WO2004/046733. Se construyó una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos (Fab) tal como se describe en el documento WO2004/046733.

La electrotransformación se realizó con 1 µg de ADN de biblioteca de fagémidos validada y 200 µl de células azules XL-1 (Stratagene). Se agregaron 3 x 1 ml de solución de SOC a 37°C para recolectar las células transformadas de las cubetas de electroporación y las células transformadas se incubaron durante 1 hora a 37°C con rotación. Se añadieron 7 ml de medio SB a 37°C con 20 µg/ml de carbenicilina y 10 µg/ml de tetraciclina y se incubaron un total de 10 ml de cultivo durante 1 hora a 37°C con agitación. Se añadió carbenicilina a una concentración final de 50 µg/ml y se continuó con la incubación durante 1 hora a 37°C con agitación. Se añadió 1 ml de fago auxiliar VCS M13 (Stratagene) con un título de 7×10^{11} ufp/ml al cultivo de azul XL1 y se incubó durante 15-30 minutos a 37°C sin agitación para permitir la infección. El cultivo se transfirió a 90 ml de medio SB que incluía 50 mg/ml de carbenicilina y 10 µg/ml de tetraciclina y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación. Finalmente, se añadió kanamicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 70 µg/ml y se incubó a 34°C con agitación durante la noche.

Los fagos se aislaron mediante centrifugación de las células a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, seguida de la adición de 25 ml de PEG6000 al 20% - NaCl 2,5 M enfriado previamente. Los fagos se precipitaron en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron (9000 rpm) durante 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El sedimento que contenía los fagos se volvió a suspender en 2 ml de PBS y se centrifugó en dos porciones de 1 ml durante 5 minutos a 14.000 rpm. La precipitación se repitió añadiendo 250 µl de PEG6000 al 20% - NaCl 2,5 M enfriado previamente/1 ml de sobrenadante, se precipitó en hielo durante 30 minutos, se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en 1 ml de PBS. La biblioteca se agrupó después de la precipitación.

Ejemplo 2

Desarrollo de anticuerpos antitoxina HT-2.

Las perlas magnéticas (Invitrogen, M-270 Epoxy Dynabeads®) se recubrieron con el conjugado de proteína fosfatasa alcalina HT-2 (proporcionado por Verifin) según las instrucciones del fabricante. Las perlas se incubaron durante 24 h en un dispositivo giratorio (Biosan Biorotator RS-multi). Después del recubrimiento, las perlas se lavaron cuatro veces con PBS y se volvieron a suspender en 50 µl de PBS. La cantidad de conjugado de proteína HT-2 unido se determinó mediante el protocolo Micro-BCA (Thermo Scientific, kit de ensayo de proteína Pierce® BCA). Las perlas magnéticas se bloquearon con solución en PBS de leche al 1% (pH 7.3) y se incubaron durante una hora en un dispositivo giratorio. Después de lavar y volver a suspender en PBS, las perlas estaban listas para su uso en la selección.

La selección de los anticuerpos anti-toxina HT-2 se realizó con un procesador de perlas magnéticas (KingFisher, ThermoFisher Scientific) utilizando el siguiente protocolo: se añadieron 200 µl de biblioteca de fagos a las perlas magnéticas recubiertas con toxina HT-2-proteína AP junto con 20 µg de proteína AP soluble y 100 µl de PBS-Tween20 (0,05%). La solución de perlas se incubó durante la noche en un dispositivo giratorio y después se lavó 5-6 veces durante 20 segundos con PBS-Tween20 (0,05%). Los fagos unidos se eluyeron con tampón TEA (trietilamina, Sigma-Aldrich), pH 11.75, y se neutralizaron con 6.9 µl de HCl 1 M antes de infectar con 900 µl de células azules bacterianas XL-1. Los anticuerpos que presentaron fagos durante la segunda ronda se prepararon tal como se ha mencionado anteriormente. Se realizaron en total cuatro rondas de selección con este protocolo, con la excepción de que la cantidad de perlas se redujo en 1 µl en cada ronda. El ADN que codifica los fragmentos Fab de cada ronda se clonó en un vector de producción pKKTac (tal como se describe en el documento WO2004/046733) y los clones individuales se cultivaron en placas de 96 pocillos y los fragmentos Fab producidos se cribaron con respecto a sus propiedades de unión mediante ELISA.

Se recogieron colonias y se transfirieron a medios de crecimiento (100 µl de SB que incluyen 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina y + 1% de glucosa/pocillo) de placas LB-amp utilizando el selector de colonias robótico Genetix QPix. Las placas se incubaron durante la noche con agitación a 37°C y 80% de humedad.

Se dispensaron 200 µl de medio de inducción (SB que incluía 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de tetraciclina, el 0.1% de glucosa e IPTG 1 mM) en placas de 96 pocillos y se inocularon 9 µl de cultivo celular reciente en placas de inducción. Las placas se incubaron de nuevo durante la noche con agitación a 37°C y 80% de humedad.

Las placas MaxiSorp (NUNC) se recubrieron con 100 ng de conjugados de toxina HT2-proteína azul en 100 µl de tampón de bicarbonato de sodio 0.1 M (pH 9.6) en cada pocillo durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock (Thermo Scientific) con Tween 20 al 0.05% (Sigma Life Sciences). Se aplicaron 100 µl de sobrenadantes de cultivo a cada pocillo y se incubaron durante una hora. Después de 3 x 200 µl de lavado de PBS, se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo de detección (fosfatasa alcalina de cabra

anti-IgG kappa de ratón, Southern Biotech) que estaba diluido 1:2000 en solución Super Block al 50%. La solución de detección fue 2 mg de PNNP en 1 ml de tampón de dietanolamina-MgCl₂ y después de 30 minutos de tiempo de incubación se midió A₄₀₅.

Los mejores clones del cribado primario se sometieron a un ELISA competitivo y se seleccionó el Fab HT2-10 para un análisis posterior. El ELISA competitivo se realizó tal como se ha descrito anteriormente, excepto la preincubación de 1 hora con toxinas HT-2 y T-2 libres en concentraciones finales de 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM y 100 pM, así como 0 pM como muestra de control). El clon HT2-10 mostró una inhibición similar para ambas toxinas HT-2 y T-2.

La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de Fab HT2-10 se establece como la SEC ID n°: 1 (figura 1a), y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Fab HT2-10 se establece como la SEC ID n°: 3. Las CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la cadena ligera de Fab HT2-10 corresponden a los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID n°: 3 (figura 2a).

La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de Fab HT2-10 se establece como SEC ID n°: 2 (figura 1b), y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab HT2-10 se establece como la SEC ID n°: 4. Las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la cadena pesada de Fab HT2-10 corresponden a los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID n°: 4 (figura 2b).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab HT2-10 (SEC ID NO: 4) es con una etiqueta de 6 His.

Ejemplo 3

Desarrollo del anticuerpo anti-complejo inmunitario para anticuerpo HT2-10 y toxina HT-2

Los anticuerpos del complejo inmunitario se seleccionaron de la biblioteca de presentación en fagos scFv humanos vírgenes VTT (la biblioteca se construyó tal como se describe en el documento WO2004/046733). La biblioteca se presentó en la superficie de hiperfagos M13 (Progen).

Se cargaron perlas magnéticas modificadas con BcMag IDA (Bioclon, N° de catálogo FF-106, 300 mg) con cobalto (Co⁺²) y los fragmentos de Fab HT2-10 purificados se inmovilizaron por medio de la etiqueta de seis histidinas de manera orientada sobre las perlas. La inmovilización se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, seguida de oxidación con H₂O₂. (Hale 1995). La concentración final fue de 3.7 mg de Fab/30 mg de perlas magnéticas.

La selección se realizó utilizando un procesador automático de perlas magnéticas (King Fisher). En primer lugar se incubaron las perlas magnéticas que contenían el clon Fab 10 anti-toxina HT2 (HT2-10) durante 60 minutos con una solución 25 µM de toxina HT-2 libre en DMSO-PBST al 1%. Después de la incubación, las perlas se lavaron durante 2 segundos y a continuación se incubaron durante 1 hora con la biblioteca de anticuerpos. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3 veces con PBST al 0.05% (30 s) y se eluyeron durante 30 minutos con glicina-HCl, pH 1.5. Los fagos eluidos se neutralizaron con 15 µl de Tris 1 M y se usaron para la infección en la siguiente ronda de selección.

Para las siguientes rondas, los fagos de salida de la primera ronda se diluyeron a una concentración de 2.5 x 10¹⁰ fagos/400 µl de PBST. Se utilizó la misma cantidad de hapteno libre en cada ronda. Los fagos de presentación multivalente se utilizaron en las primeras tres rondas, mientras que la presentación monovalente se utilizó en la última ronda de selección. En la segunda ronda se utilizó un Fab antihapteno soluble para agotar los aglutinantes para la región constante común de los fragmentos Fab. La tercera y cuarta ronda de selección se agotaron con un clon anti-HT2-10 inmovilizado sin toxina HT-2.

Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces con tampón PBST (2 min) y se eluyeron 30 min con glicina-HCl, pH 1.5.

Se utilizó un ELISA en fagos para elegir la mejor ronda de selección que tuviera la mayor relación entre los pocillos que contienen el hapteno y los pocillos en blanco. Se analizaron clones de fagos individuales de la mejor ronda de selección y se secuenciaron los mejores clones. El mejor HT2-10 (H5) anti-IC se sintetizó como un fragmento Fab (DNA 2.0). El anticuerpo monocatenario (scFv) correspondiente se clonó en un vector de producción que contenía la fosfatasa alcalina como pareja de fusión.

Los anticuerpos y la proteína de fusión de fosfatasa alcalina contienen seis etiquetas de histidina para propósitos de purificación e inmovilización. Se produjeron en bacterias *Escherichia coli* (anti HT2-10 en el plásmido pKKTac en la cepa RV308 (ATCC 31608), HT2-10 (H5) anti-IC en el plásmido pJExpress (DNA 2.0) en la cepa RV308, fusión HT2-10 (scFv H5)-AP anti-IC en plásmido pJExpress en la cepa RV308. Todos los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad metálica según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare).

La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC se establece como la SEC ID n°: 5 (Fig. 3a), y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC se establece como la SEC ID n°: 7. Las CDR CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC corresponden a los aminoácidos 24-37, 53-59, 92-102 de la SEC ID n°: 7 (Fig. 4a).

La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC se establece como la SEC ID n°: 6 (Fig. 3b), y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC se establece como la SEC ID n°: 8. Las CDR CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC corresponden a los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8 (Fig. 4b).

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del Fab HT2-10 anti-IC (SEC ID NO: 8) está con una etiqueta de 6 His.

Ejemplo 4

Ensayo de complejo inmunitario de una única etapa (FRET)

El par de anticuerpos del complejo inmunitario se marcó con diferentes marcadores fluorescentes. El anticuerpo primario HT2-10 se marcó con quelato de europio (Kaivogen Loisto615). Se disolvieron 0.1 mg de quelato de europio ITC en DDIW, se mezclaron con 0.3 mg de anticuerpo primario HT2-10 y se hicieron girar durante la noche a 4°C. El tampón de la mezcla de conjugación se cambió a Tris 50 mM, pH 7.8; NaCl al 0.9% utilizando columnas NAP5 (GE Healthcare). El nivel de conjugación se determinó utilizando patrón de europio (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante (kit Perkin Elmer Lance®).

El anticuerpo anti-complejo inmunitario H5 se marcó con la marca Alexa Fluor 647 utilizando el kit de marcado de proteínas Alexa Fluor según las instrucciones del fabricante (Molecular probes Inc.).

Principio de ensayo

Se añadió 1 µg de ambos anticuerpos marcados a los pocillos de microvaloración en un volumen de 10 µl (diluido en PBS) y se pipetearon 80 µl de muestra en los reactivos. La especificidad se determinó mediante la adición de PBS pH 7.4 con toxina HT-2 y concentraciones de toxina T-2 de 0, 5, 10, 50 y 100 ng/ml (figura 7). La linealidad del ensayo se determinó añadiendo PBS o metanol al 10%/agua con concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 ng/ml de toxina HT-2 (figuras 9 y 10 para PBS y metanol al 10%/agua, respectivamente). Después de añadir la muestra, la placa se agitó brevemente y se sometió a medición utilizando un fluorómetro Victor V (Perkin Elmer Wallac) después de 5 minutos (excitación a 340 nm y detección a 665 nm).

Los anticuerpos marcados también se pueden secar en la parte inferior de la placa de ensayo. En este formato más rápido y simple, el usuario solo añade la muestra y somete la placa a medición después de unos minutos (figura 11 y 12).

Ejemplo 5

Ensayo ELISA simple (AP)

El Fab anti-HT2/T2 (10) se biotiniló añadiendo 3 x exceso molar de sulfo-NHS-SS-biotina en PBS y se incubó durante 30 minutos con rotación según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Pierce). El Fab anti-HT2/T2 biotinilado (10) se purificó mediante Econopac (Bio-Rad). Las concentraciones de proteína se midieron a partir de las fracciones de elución mediante Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y las fracciones que tenían más de 0.3 mg/ml de proteína se agruparon. El éxito de la biotinilación se verificó inmovilizando 500 ng/pocillo del anticuerpo primario biotinilado a la placa de estreptavidina (Kaivogen) y añadiendo 500 ng de conjugado toxina HT-2 AP. Como control, se utilizó Fab anti-HT2/T2 no biotinilado (10). Después de lavar tres veces con PBS, al sustrato AP se añadieron 2 mg/ml de PNPP (Sigma) en tampón de dietanolamina-MgCl₂ (Reagena) y se detectó la cantidad de HT2-AP unido midiendo el A405.

El vector pJExpress401 con proteína de fusión de fosfatasa alcalina se encargó de DNA2.0.

El clon del complejo anti-inmunitario HT2-10 (H5) anti-IC se clonó en el vector AP digiriendo el constructo monocatenario completo del vector fagémido (NcoI/NotI) y uniéndolo al vector pJExpress401 AP digerido con 2 x NcoI/NotI.

La fusión scFv-AP se produjo en células bacterianas en cultivo en frascos a pequeña escala y se purificó mediante cromatografía de afinidad metálica según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare)

Principio de ensayo:

El anticuerpo primario biotinilado HT2-10 se inmoviliza en la superficie de las placas de microvaloración de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Kaivogen Kaisa96) durante 30 minutos. Se utilizaron 200 µl de 0.2 µg/ml de biotina libre como solución de bloqueo. La muestra de 50 µl que incluye la toxina HT-2 del analito se mezcla con 50 µl de anticuerpo secundario H5 y se pipetea en el pocillo al mismo tiempo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después de tres lavados con 200 µl de tampón PBS, se añade el sustrato para AP (2 mg/ml de PNPP (Sigma) en etanolamina-MgCl₂ (Reagena)) y se mide la absorbancia A405.

El ensayo de AP es específico para la toxina HT-2 sin reactividad cruzada detectable con la toxina T-2. (Figura 13). El ensayo Elisa simple que utiliza la fusión scFv-AP se puede aplicar también a muestras que contienen metanol al 10% (Figura 14).

Ejemplo 6Ensayo de flujo lateral para la toxina HT-2

El Fab anti-HT2-10 se acopló a nanopartículas de oro de 40 nm mediante la adición de 2.5 µg/ml de Fab a una solución de oro coloidal (soluciones BBI) con el 3% de BSA (Sigma). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente en rotación, el anticuerpo no unido se separó de los fragmentos Fab conjugados centrifugando durante 15 minutos a 8000 g y lavando el conjugado una vez con agua destilada estéril (MilliQ). Las nanopartículas de oro que contenían Fab anti-HT2-10 se resuspendieron en BSA al 1% en agua después de otra centrifugación durante 15 minutos a 8000 g.

Para la línea de ensayo, el anticuerpo Fab HT2-10 (H5) anti-IC (1 mg/ml) y para la línea de control, el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (específico de Fab) (Sigma) (1 mg/ml) se pulverizaron sobre una membrana de nitrocelulosa prebloqueada (MDI Membrane Technologies) (300 mm x 20 mm) utilizando los instrumentos ZX1000 y Air Jet Quanti (BioDot).

Las membranas pulverizadas se secaron durante la noche a 24°C y se montaron en una tarjeta de apoyo con una mecha de muestra (300 mm x 27 mm, Whatman CF5) que se superponía 1 mm. Las tiras de ensayo de 4.5 mm se cortaron utilizando un cortador de guillotina CM4000 (BioDot).

El anticuerpo primario Fab anti-HT2-10 marcado con oro coloidal se mezcló en un pocillo de microvaloración no tratado con el tampón de procesamiento y la muestra. La tira de LFA se introdujo en un pocillo de microvaloración y el resultado se leyó después de 10 minutos. El color rojo en las líneas de ensayo y de control indica una muestra positiva. La línea de control roja solo indica una muestra negativa y que la tira de ensayo es válida. Estos resultados muestran que el ALF es específico para la toxina HT-2 y no reacciona de forma cruzada con la toxina T-2 (Figura 15).

Referencias

Dzantiev, B.B., Byzova, N.A., Urusov, A.E. y Zherdev, A.V. (2014) Trends in Analytical Chemistry 55: 81-93.

Gonzales-Techera, A., Vanrell, L., Hammock, B.D. y Gonzales-Sapienza, G. (2007) Anal. Chem 79: 7799-7806.

Hale J. E (1995) Analytical biochemistry 231: 46-49.

Hara *et al.* (2013) Analytica Chimica Acta 793: 107-113.

Hemmilä I. *et al.*, (1988), Clin. Chem. 34: 2320-2322.

Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Li, T., Jeon, K-S., Suh, Y.D. y Kim, M.-G. (2011) Chem. Comun. 47: 9098-9100.

Li, P., Zhang, Z., Hu, X. y Zhang Q. (2013) Mass Spectrometry Reviews 32: 420-452.

Li, T., Byun, J-Y, Kim, B.B., Shin, Y.-B. y Kim, M.-G. (2013) Biosensors and Bioelectronics 42: 403-408.

Ueda *et al.* (1996) Vanrell, L., Gonzales-Techera, A., Hammock, B.D. y Gonzalez-Sapienza, G. (2013) Analytical Chemistry 85: 1177-1182.

Recomendación de la Comisión de 27 de marzo de 2013 sobre la presencia de toxina T-2 y HT-2 en cereales

y productos de cereales (2013/165/EU).

Listado de secuencias

5	<110> VTT Technical Research Centre	
	<120> Inmunoensayo	
	<130> B4092PFI	
10	<160> 10	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 642	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
20	<400> 1	
	gatattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcacc	60
	atcacctgca aggccagtc gaatgttcgt tctgtctgtag cctgggtatca acagaaacca	120
	gggcagtctc cttaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctaata	180
	cgcttcacag gcggtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct	240
	gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagtt atcctctcac gttcggtagt	300
	gggaccaagc tggacctgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca	360
	tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac	420
	cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg	480
	aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg	540
	ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca	600
	tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt	642
25	<210> 2	
	<211> 681	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
30	<400> 2	
	gatgtgcagc ttcaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
	acctgtcttg tcaactggcta ctccatcacc agtgggtatt tctggaactg gatccggcag	120
	tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc tacataaggt acgacggtaa caaagactat	180
	aacctatctc ttaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
	ctgaagttag attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc aagagtccgg	300
	tacgacgtta actactgggg tocaggaacc tcagtcaccg tctcgtcagc caaaacgaca	360
	cccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgtctgcc aaactaactc catggtgacc	420
	ctgggatgcc tggtaagggt ctatttccct gagccagtga cagtgcacct gaactctgga	480

ES 2 709 823 T3

tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg 540
 agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacggt 600
 gccaccccg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgtgcggcc 660
 gcacatcatc atcatcatca t 681

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Ser Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 4

<211> 227

ES 2 709 823 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

5

```

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
          20          25          30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
          35          40          45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Asp Gly Asn Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu
50          55          60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65          70          75          80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Val Arg Tyr Asp Val Asn Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val
          100          105          110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
          115          120          125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
          130          135          140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
145          150          155          160

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
          165          170          175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
          180          185          190

Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
          195          200          205

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Ala Ala Ala His His His
210          215          220

His His His
225

```

10

<210> 5
<211> 654
<212> ADN
<213> Mus musculus

15

<400> 5

ES 2 709 823 T3

ctgcaggccg tgctgacgca gccgagcagc gttagcgggtg caccagggtca acgtgtgacc 60
atctcctgta ctggttcgtc tagcaatatt ggtgccgggtt acgatgtgca ctggtaccaa 120
cagctgccgg gcaccgcgcc taaactgctg atctatggta acaacaatcg cccgagcgggt 180
gtccccggacc gcttcagcgg cagcaaatcc ggcacgagcg cgtcgctggc gattagcggc 240
ctgcaatccg aggacgaggg cgactactac tgcgcgacct gggacgattc tctgaacgggt 300
gtcgtttttg gtggcgggtac caaggtcacc gttctggggc agccgaaggc ggctccgagc 360
gttaccctgt tcccgcggag ctctgaagaa ctgcaggcaa acaaagcgac cctggtctgc 420
ctgatttctg acttttatcc gggtgaggtt acggttgctg ggaaggcgga cagcagcccg 480
gttaaagccg gcgtcgaaac caccacgccg agcaagcaaa gcaacaataa gtacgcccg 540
agcagctacc tgcgctgac cccggaacaa tggaaatccc ataaaagcta cagctgccag 600
gtgacgcatg aggggtccac cggtgagaaa accgtggcgc cagcagaatg tagc 654

<210> 6
<211> 681
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 6

caagtccagc tgcagcagag cggcgagag gttaagaaac ctggtgccag cgttaagggtg 60
agctgcaaag cgagcgggta taccttact agctactata tgcactgggt ccgccaagct 120
ccggggccagg gtttggaatg gatgggtatc atcaaccctg ctggcggttag caccagctat 180
gcgcaaaagt tccagggccg tgtcacgatg actcgtgata cgagcaccag caccgtctac 240
atggagctgt ccagcctgcy tagcgaggat accgcgggtt actactgtgc gcgtgatgag 300
ggttatgggtg attatgttta ttggggccag ggcaccctgg tcacgggtgag cagcgcgagc 360
accaagggtc cgagcgtctt tccgctggcg ccgtcgagca aaagcacgag cgggtggcacg 420
gcggcactgg gttgcctggt aaaggactat tttccggagc cggtgaccgt gagctggaat 480
agcggtgccc tgacgtccgg cggtcacacc ttcccggctg tgctgcagtc cagcggctctg 540
tatagcctga gcagcgtggt gactgtgccg tctagctctt tgggcacgca aacctacatt 600
tgcaacgtta atcataagcc gagcaatacc aaagtggaca agaaggcgga accgaaatcc 660
tgtcaccatc accaccatca c 681

<210> 7
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 709 823 T3

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

5 <210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 8

ES 2 709 823 T3

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

His His His
225

- 5 <210> 9
 <211> 2133
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Proteína de fusión artificial: Homo sapiens + Escherichia coli
 <400> 9

ES 2 709 823 T3

caggtacagc	tgcagcagtc	aggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
tcctgcaagg	catctggata	caccttcacc	agctactata	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagt	gatgggaata	atcaacccta	gtggtggtag	cacaagctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccatg	accagggaca	cgtccacgag	cacagtctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagatgag	300
ggctacggtg	actacgtcta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctcactcgag	360
ggtggtggtg	gttctggggg	cggaggatcc	ggcgggggag	ggtcagagct	ccaggctgtg	420
ctcactcagc	cgtcctcagt	gtctggggcc	ccagggcaga	gggtcaccat	ctcctgcact	480
ggaagcagct	ccaacatcgg	ggcaggttat	gatgtacact	ggtagcagca	gcttccagga	540
acagcccca	aactcctcat	ctatgggaac	aacaatcggc	cctcaggggt	ccctgaccga	600
ttctctggct	ccaagtctgg	aacctcagcc	tccttgcca	tcagtgggct	ccagtctgag	660
gacgaggctg	attattactg	tgaacatgg	gatgacagcc	tgaatggtgt	ggtatttggc	720
ggagggacca	aggtcaccgt	cctaggtgcg	gccgcacgta	ctccggaaat	gccggtgctg	780
gaaaatcgtg	ctgcacaggg	cgatatcacg	gcgcctggcg	gtgctcgccg	cttgacgggc	840
gatcagaccg	ctgctctgcg	tgatagcctg	agcgacaaac	cggcgaaaaa	catcattctg	900
ctgattggcg	atggtatggg	cgacagcgag	attaccgctg	cgcgtaacta	cgctgaggg	960
gccggtggtt	tctttaaagg	tattgacgcg	ctgccgctga	cgggccaata	caccactac	1020
gccctgaata	agaaaacggg	taagccggac	tatgttaccg	acagcgcggc	atcggaacc	1080
gcgtggagca	ccggcgtcaa	aacctataac	ggtgcgttgg	gcgttgacat	tcacgaaaag	1140
gaccaccoga	ccatcctgga	aatggcaaaa	gcggctggtc	tggcgacggg	taacgttagc	1200
accgcggaac	tgcaagacgc	gaccccgga	gactgggtgg	cacacgtcac	cagccgtaaa	1260
tgctacggtc	cgagcgcaac	cagcgaaaag	tgcccggtga	atgccctgga	gaaagtggtg	1320
aaaggttcca	ttacggaaca	actgctgaat	gcgcgtgccc	atgttacgct	gggtggtggc	1380
gccaagacgt	ttgcggaaac	ggcgaccgcg	ggtgaatggc	aaggcaaaac	gttgcgcgaa	1440
caagcgaggg	cgcgtggcta	ccaactggtt	agcgacgcgg	caagcctgaa	cagcggtacc	1500
gaggcgaacc	agcaaaaacc	gctgctgggt	ctgttcgctg	acggtaacat	gccggttcgt	1560
tggctgggtc	cgaaagccac	gtaccacggt	aatatcgata	aaccggcggt	tacgtgcact	1620
ccgaatccgc	aacgtaatga	tagcgttccg	accctggctc	aaatgacgga	caaagcaatt	1680
gagctgctga	gcaagaatga	gaagggcttt	ttcctgcaag	ttgaggggtg	gagcattgat	1740
aaacaggatc	atgcagcgaa	cccgtgcggc	cagattggtg	aaaccgttga	cctggacgaa	1800
gcggtgcagc	gtgcgctgga	gttcgccaag	aaagagggca	ataccttggt	catcgtcacc	1860
gcggatcacg	cacatgcgag	ccagatcggt	gcaccggata	cgaaggcacc	gggcctgacc	1920
caagcgctga	acaccaaaga	cgggtgcggt	atggttatga	gctacggcaa	tagcgaagag	1980
gatagccaag	agcatacggg	cagccaactg	cgcattgctg	cctatggtcc	gcacgcggcg	2040
aatgtggtgg	gtctgaccga	tcaaaccgac	ctgttttaca	ccatgaaggc	ggctctgggc	2100
ctgaaaggcg	gtggtcatca	ccatcaccac	cat			2133

<210> 10
 <211> 711
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión artificial: Homo sapiens + Escherichia coli

 <400> 10
 10
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

ES 2 709 823 T3

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Gly Tyr Gly Asp Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro
 130 135 140
 Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn
 180 185 190
 Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr
 195 200 205
 Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro
 260 265 270
 Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp
 275 280 285
 Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp
 290 295 300
 Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln
 325 330 335

ES 2 709 823 T3

Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val
 340 345 350
 Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr
 355 360 365
 Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr
 370 375 380
 Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser
 385 390 395 400
 Thr Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val
 405 410 415
 Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro
 420 425 430
 Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu
 435 440 445
 Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe
 450 455 460
 Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu
 465 470 475 480
 Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu
 485 490 495
 Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe
 500 505 510
 Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr
 515 520 525
 His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln
 530 535 540
 Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile
 545 550 555 560
 Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly
 565 570 575
 Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile
 580 585 590

ES 2 709 823 T3

Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe
	595						600					605			
Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala
610						615					620				
His	Ala	Ser	Gln	Ile	Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr
625					630					635					640
Gln	Ala	Leu	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly
				645					650					655	
Asn	Ser	Glu	Glu	Asp	Ser	Gln	Glu	His	Thr	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile
		660						665					670		
Ala	Ala	Tyr	Gly	Pro	His	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Asp	Gln
	675						680					685			
Thr	Asp	Leu	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Lys	Gly	Gly
690						695					700				
Gly	His	His	His	His	His	His	His								
705						710									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Pareja de unión que reconoce un complejo inmunitario entre la toxina HT-2 y el anticuerpo anti-toxina HT-2 y que comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID nº: 7, respectivamente y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID nº: 8, respectivamente.
- 10 2. Pareja de unión según la reivindicación 1, en la que la pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
3. Pareja de unión según la reivindicación 1 o 2, en la que la pareja de unión forma un fragmento de anticuerpo Fab, scFv, o un anticuerpo monoclonal recombinante.
- 15 4. Pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que la pareja de unión comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID nº: 7 y la SEC ID nº: 8.
5. Kit de ensayo que comprende la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Kit de ensayo según la reivindicación 5, que comprende además otra pareja de unión que comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID nº: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID nº: 4, respectivamente.
- 25 7. Kit de ensayo según la reivindicación 6, en el que dicha otra pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
8. Kit de ensayo según las reivindicaciones 6 a 7, en el que dicha otra pareja de unión forma un fragmento de anticuerpo Fab, scFv, o un anticuerpo monoclonal recombinante.
- 30 9. Kit de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha otra pareja de unión reconoce específicamente la toxina HT-2, o tanto la toxina HT-2 como la toxina T-2.
- 35 10. Kit de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende unos reactivos para un inmunoensayo homogéneo no competitivo.
- 40 11. Kit de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende unos reactivos para el ensayo de transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET).
12. Polinucleótido que codifica la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 45 13. Célula hospedadora aislada que ha sido transformada con un polinucleótido que codifica la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y que resulta apta para expresar la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Utilización de la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para detectar un analito en una muestra de alimento o pienso para animales.
- 50 15. Utilización de la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para detectar un analito en una muestra tomada de un ser humano o un animal expuesto a una toxina HT-2.
16. Utilización de la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para detectar un analito en una muestra ambiental.
- 55 17. Procedimiento para detectar la toxina HT-2 en una muestra, que comprende
 - hacer reaccionar la muestra con un par de reactivos que comprende una primera pareja de unión que se une a una toxina HT-2 o una toxina T-2 en la muestra para formar un complejo, y una segunda pareja de unión que se une específicamente a dicho complejo; y
 - 60 - determinar la unión de la segunda pareja de unión al complejo, indicando así la presencia de la toxina HT-2 en la muestra,
- 65 en el que dicha primera pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEC ID nº: 3, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-36, 51-66 y 99-105 de la SEC ID nº: 4, respectivamente, y

dicha segunda pareja de unión comprende las CDR1-3 de cadena ligera que comprenden los aminoácidos 24-37, 53-59 y 92-102 de la SEC ID n°: 7, respectivamente, y las CDR1-3 de cadena pesada que comprenden los aminoácidos 31-35, 50-65 y 99-107 de la SEC ID n°: 8, respectivamente.

- 5 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la presencia de la toxina HT-2 se determina utilizando un inmunoensayo.
- 10 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el inmunoensayo es un inmunoensayo homogéneo no competitivo.
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el inmunoensayo homogéneo no competitivo es un ensayo de transferencia de energía de resonancia fluorescente resuelta en el tiempo (TR-FRET).
- 20 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que dicho inmunoensayo se selecciona de entre el grupo que consiste en un radioinmunoensayo, un ensayo enzimoimmunoensayo de adsorción, un ensayo de flujo lateral, un ensayo de aglutinación de partículas, un ensayo de tipo sándwich, un ensayo de micromatriz de proteínas, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo de captura de antígeno, un inmunoensayo de fluorescencia y un inmunoensayo de luminiscencia.
- 25 22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en el que dicho inmunoensayo está en un formato de ensayo directo.
- 30 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo de una muestra de alimento, una muestra de pienso, una muestra de materia prima de alimentos, una muestra de materia prima de piensos, una muestra ambiental y una muestra procedente de un ser humano o de un animal o de un microbio.
- 35 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en el que el inmunoensayo se utiliza en un sensor.
25. Utilización de la pareja de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un sensor.
26. Anticuerpo según la reivindicación 2 producido en un clon de bacteria *Escherichia coli* depositado en la VTT Culture Collection con el número de acceso VTT E-143343.
27. Kit de ensayo según la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo se produce en un clon de bacteria *Escherichia coli* depositado en la VTT Culture Collection con el número de acceso VTT E-143342.

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de Fab HT2-10:

GATATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACA
GGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTTTCGTTCTGCTGTAGCCT
GGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCAT
CCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTAATCGCTTCACAGGCGGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCACTCTGAAGACTTGGCAGAGTA
TTTCTGTCAGCAATATAACAGTTATCCTCTCACGTTTCGGTAGTGGGACCAAG
CTGGACCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCA
TCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAAC
AACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAA
CGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGC
ACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGA
CATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATTG
TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

Fig. 1a

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de Fab HT2-10:

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCT
CTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTTCT
GGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACA
TAAGGTACGACGGTAACAAAGACTATAACCCATCTCTTAAAAATCGAATCTC
CATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCTGAAGTTGAATTCTGTG
ACTACTGAGGACACAGCTACATTAATCTGTGCAAGAGTCCGGTACGACGTT
AACTACTGGGGTCCAGGAACCTCAGTCACCGTCTCGTCAGCCAAAACGACA
CCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCA
TGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAG
TGACCTGGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTG
TCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCCTCCAG
CACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCAACCGGCCAGCA
GCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGCGGCCGCACAT
CATCATCATCATCAT

Fig. 1b

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Fab HT2-10:

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVITTC**KASQNVRSAVA**WYQQKPGQSPKALIY**S**
ASYRYSGVPNRFTGGGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC**QQYNSYPLT**FGSG
TKLDLKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE
RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV
KSFNRNEC

Fig. 2a

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Fab HT2-10:

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSIT**SGYFWN**WIRQFPGNKLEWMGY
IRYDGNKDYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAR**VRYD**
VNYWGPGETSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVT
VTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASST
KVDKKIVPRDCAAAHHHHHH

Fig. 2b

Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC:

CTGCAGGCCGTGCTGACGCAGCCGAGCAGCGTTAGCGGTGCACCAGGTCA
ACGTGTGACCATCTCCTGTACTGGTTCGTCTAGCAATATTGGTGCCGGTTAC
GATGTGCACTGGTACCAACAGCTGCCGGGCACCGCGCCTAAACTGCTGATC
TATGGTAACAACAATCGCCCGAGCGGTGTCCCGGACCGCTTCAGCGGCAG
CAAATCCGGCACGAGCGCGTCGCTGGCGATTAGCGGCCTGCAATCCGAGG
ACGAGGCCGACTACTACTGCGCGACCTGGGACGATTCTCTGAACGGTGTCTG
TTTTTGGTGGCGGTACCAAGGTCACCGTTCTGGGCCCAGCCGAAGGCGGCT
CCGAGCGTTACCCTGTTCCCGCCGAGCTCTGAAGAACTGCAGGCAAACAAA
GCGACCCTGGTCTGCCTGATTTCTGACTTTTATCCGGGTGCAGTTACGGTTG
CGTGGAAGGCGGACAGCAGCCCGGTTAAAGCCGGCGTCGAAACCACCACG
CCGAGCAAGCAAAGCAACAATAAGTACGCCGCGAGCAGCTACCTGTCGCTG
ACCCCGGAACAATGGAAATCCCATAAAAGCTACAGCTGCCAGGTGACGCAT
GAGGGTTCCACCGTTGAGAAAACCGTGGCGCCAGCAGAATGTAGC

Fig. 3a

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC:

CAAGTCCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCAGAGGTTAAGAAACCTGGTGCCAG
CGTTAAGGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGTTATACCTTCACTAGCTACTATAT
GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCGGGCGCAGGGTTTGAATGGATGGGTATCA
TCAACCCGTCTGGCGGTAGCACCAGCTATGCGCAAAAGTTCCAGGGCCGTG
TCACGATGACTCGTGATACGAGCACCAGCACCCTCTACATGGAGCTGTCCA
GCCTGCGTAGCGAGGATACCGCGGTTTACTACTGTGCGCGTGATGAGGGTT
ATGGTGATTATGTTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACGGTGAGCAGCG
CGAGCACCAAGGGTCCGAGCGTCTTTCCGCTGGCGCCGTGAGCAAAAGC
ACGAGCGGTGGCACGGCGGCACTGGGTTGCCTGGTAAAGGACTATTTTCC
GGAGCCGGTGACCGTGAGCTGGAATAGCGGTGCCCTGACGTCCGGCGTTC
ACACCTTCCCGGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGTCTGTATAGCCTGAGCAGCG
TGGTGACTGTGCCGTCTAGCTCTTTGGGCACGCAAACCTACATTTGCAACG
TTAATCATAAGCCGAGCAATACCAAAGTGGACAAGAAGGCGGAACCGAAAT
CCTGTCACCATCACCACCATCAC

Fig. 3b

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de HT2-10 (H5) anti-IC:

LQAVLTQPSSVSGAPGQRVTISC**TGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLIY
GNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC**ATWDDSLNGV**
VFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGS
TVEKTVAPAECS

Fig. 4a

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de HT2-10 (H5) anti-IC:

QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYMH**WVRQAPGQGLEWMGI
INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR**DEG**
YGDYVYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKAEPKSCHHHHHH

Fig. 4b

Secuencia de nucleótidos de fusión de AP del anticuerpo secundario anti-IC scFv HT2-10 (H5)-AP:

**CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
GGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCG
ACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGGTGGTA
GCACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCC
ACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA
TACTGTGCGAGAGATGAGGGCTACGGTGACTACGTCTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTACACGTCTCCTCA**

CTCGAGGGTGGTGGTGGTTCTGGGGGCGGAGGATCCGGCGGGGGAGGGTCAGAGCTC

**CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACC
ATCTCCTGCACTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTAC
CAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGGAACAACAATCGGCCC
TCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCC
ATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGAC
AGCCTGAATGGTGTGGTATTTGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTGCGGC
CGCA**

CGTACTCCGGAAATGCCGGTGCTGGAAAATCGTGCTGCACAGGGCGATATCACGGCGCCTG
GCGGTGCTCGCCGCTTGACGGGCGATCAGACCGCTGCTCTGCGTGATAGCCTGAGCGACA
AACCGGCGAAAAACATCATTCTGCTGATTGGCGATGGTATGGGCGACAGCGAGATTACCGC
TGCGCGTAACCTACGCTGAGGGTGCCGGTGGTTTCTTTAAAGGTATTGACGCGCTGCCGCTG
ACGGGGCCAATACACCCACTACGCCCTGAATAAGAAAACGGGTAAAGCCGGACTATGTTACCG
ACAGCGCGGCATCGGCAACCGCGTGAGCACCAGCGTCAAAACCTATAACGGTGCGTTGG
GCGTTGACATTACGAAAAGGACCACCCGACCATCCTGGAAATGGCAAAGCGGCTGGTCT
GGCGACGGGTAACGTTAGCACCGCGGAACTGCAAGACGCGACCCCGGCAGCACTGGTGGC
ACACGTCAACAGCCGTAAATGCTACGGTCCGAGCGCAACCAGCGAAAAGTGCCCGGGTAAT
GCCCTGGAGAAAAGGTGGCAAAGGTTCCATTACGGAACAACCTGCTGAATGCGCGTGCCGATG
TTACGCTGGGTGGTGGCGCCAAGACGTTTTCGCGAAACGGCGACCGCGGGTGAATGGCAAG
GCAAAACGTTGCGCGAACAAGCGCAGGCGCGTGCTACCAACTGGTTAGCGACGCGGCAA
GCCTGAACAGCGTTACCGAGGCGAACCAGCAAAAACCGCTGCTGGGTCTGTTGCGGACG
GTAACATGCCGTTTCGTTGGCTGGGTCCGAAAGCCACGTACCACGGTAATATCGATAAACC
GGCGGTTACGTGCACTCCGAATCCGCAACGTAATGATAGCGTTCGACCCCTGGCTCAAATG
ACGGACAAAGCAATTGAGCTGCTGAGCAAGAATGAGAAGGGCTTTTTCTGCAAGTTGAGG
GTGCGAGCATTGATAAACAGGATCATGCAGCGAACCCGTGCGGCCAGATTGGTGAAACCGT
TGACCTGGACGAAGCGGTGCAGCGTGCGCTGGAGTTCCGCAAGAAAGAGGGCAATACCTT
GGTCATCGTCACCGCGGATCACGCACATGCGAGCCAGATCGTTGCACCGGATACGAAGGCA
CCGGGCCTGACCCAAGCGCTGAACACCAAAGACGGTGCGGTTATGGTTATGAGCTACGGCA
ATAGCGAAGAGGATAGCCAAGAGCATACGGGCAGCCAACTGCGCATTGCGGCCCTATGGTCC
GCACGCGGCGAATGTGGTGGTCTGACCGATCAAACCGACCTGTTTTACACCATGAAGGCG
GCTCTGGGCCTGAAAGGCGGTGGTCATCACCATCACCACCAT

Fig. 5

Secuencia de aminoácidos de fusión AP del anticuerpo secundario anti-IC scFv HT2-10 (H5)-AP:

**QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSG
GSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDEGYGDYVYWGQG
TLVTVSS**

LEGGGGSGGGGSGGGGSEL

**QAVLTQPSSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNNR
PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGVVFGGGTKVTVLGA
AA**

RTPEMPVLENRAAQGDITAPGGARRLTGDQTAALRDSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAARN
YAEAGAGGFFKGIDALPLTGQYTHYALNKKTGKPDYVTD SAASATAWSTGVKTYNGALGVDIHE
KDHPTILEMAKAAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSRKCYGPSATSEKCPGNALEKGGKG
SITEQLLNARADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGKTLREQAQARGYQLVSDAASLNSVTEANQ
QKPLLGLFADGNMPVRWLGP KATYHGNIDKPAVTCTPNPQRNDSVPTLAQMTDKAIELLSKNE
KGFFLQVEGASIDKQDHAANPCGQIGETVDLDEAVQRALEFAKKEGNTLVIVTADHAHASQIV
APDTKAPGLTQALNTKDGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQRLIAAYGPHAANVVGLTDQTDLF
YTMKAALGLKGGGHHHHHH

Fig. 6

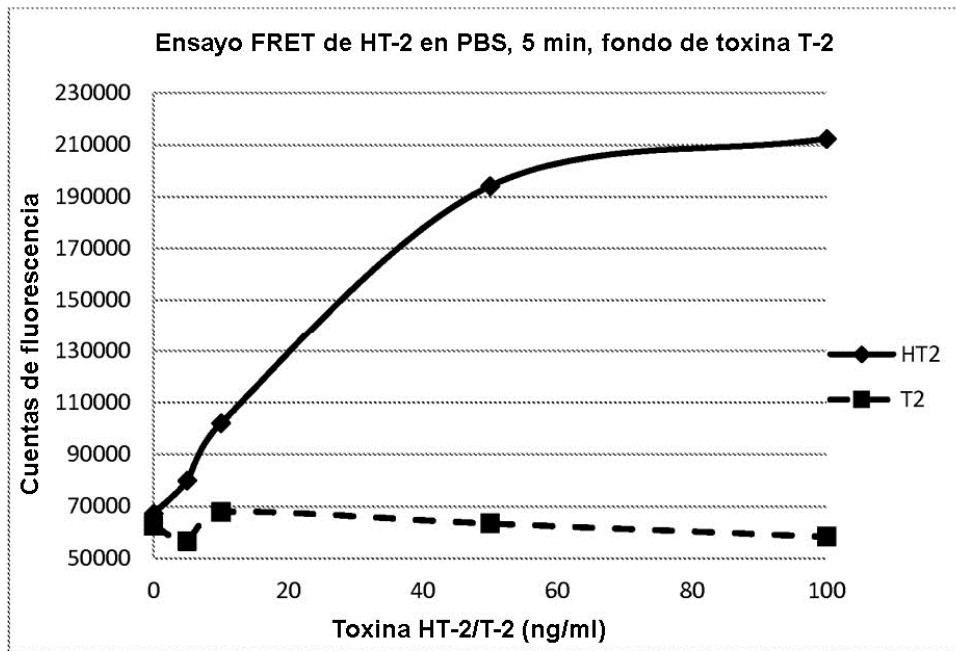


Fig. 7

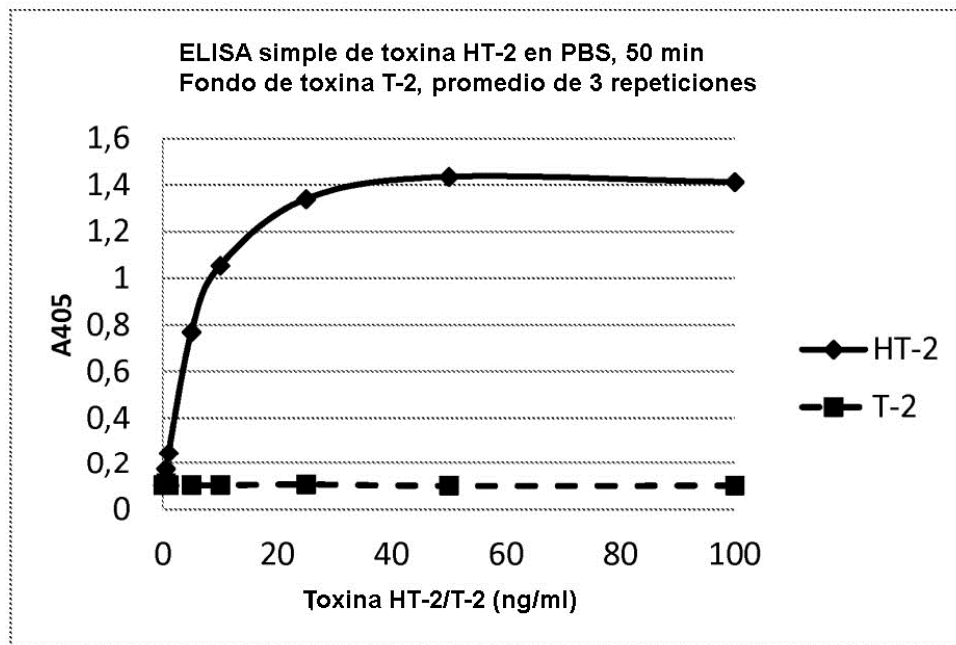


Fig. 8

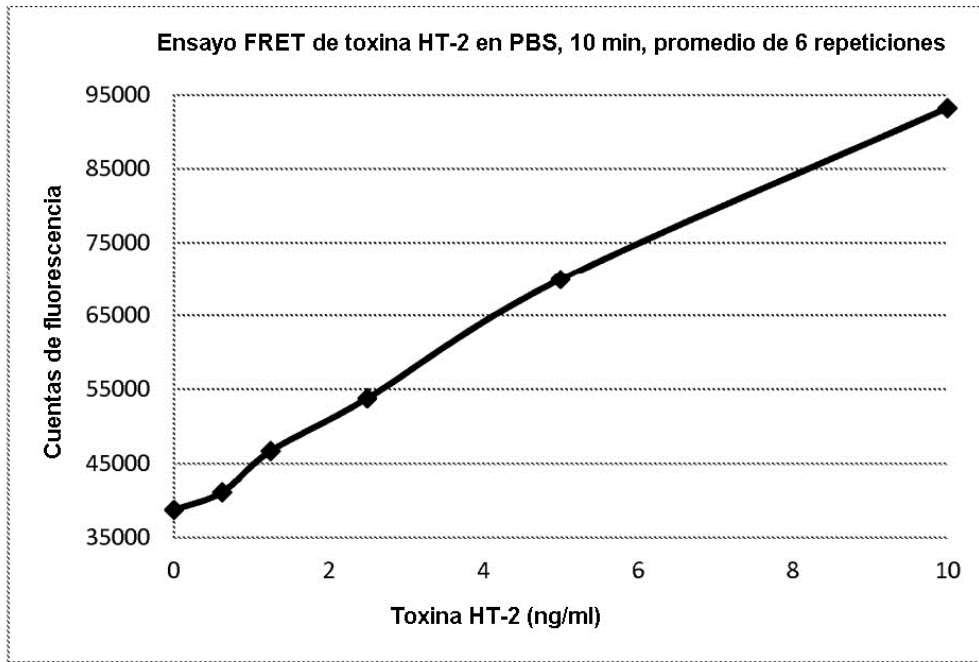


Fig. 9

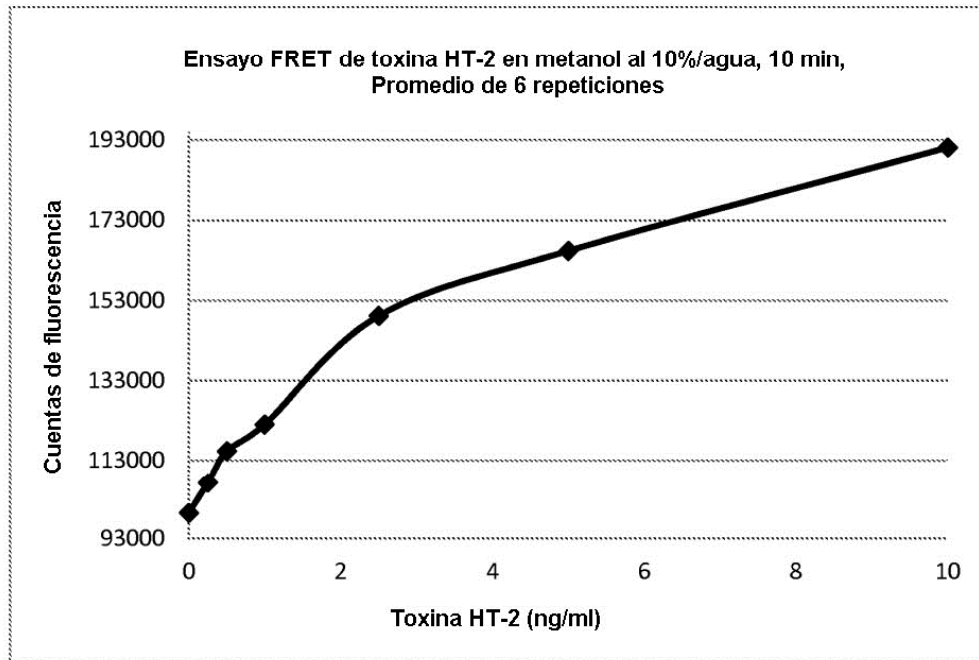


Fig. 10

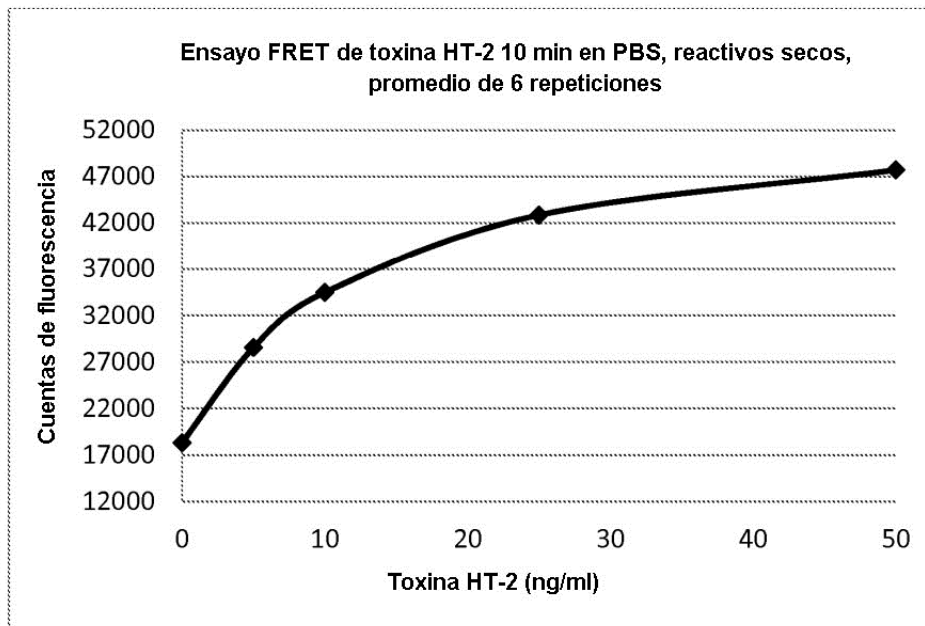


Fig. 11

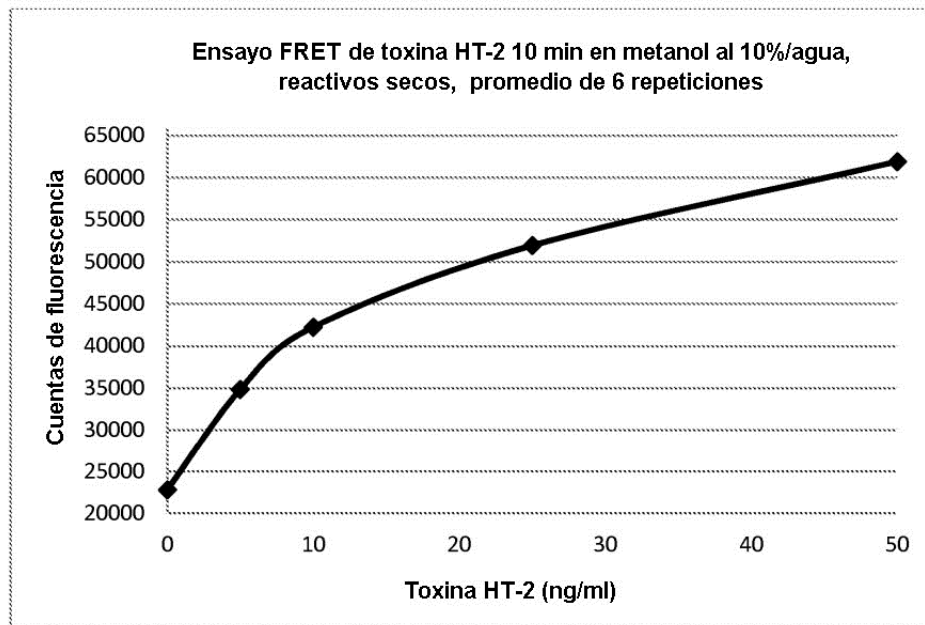


Fig. 12

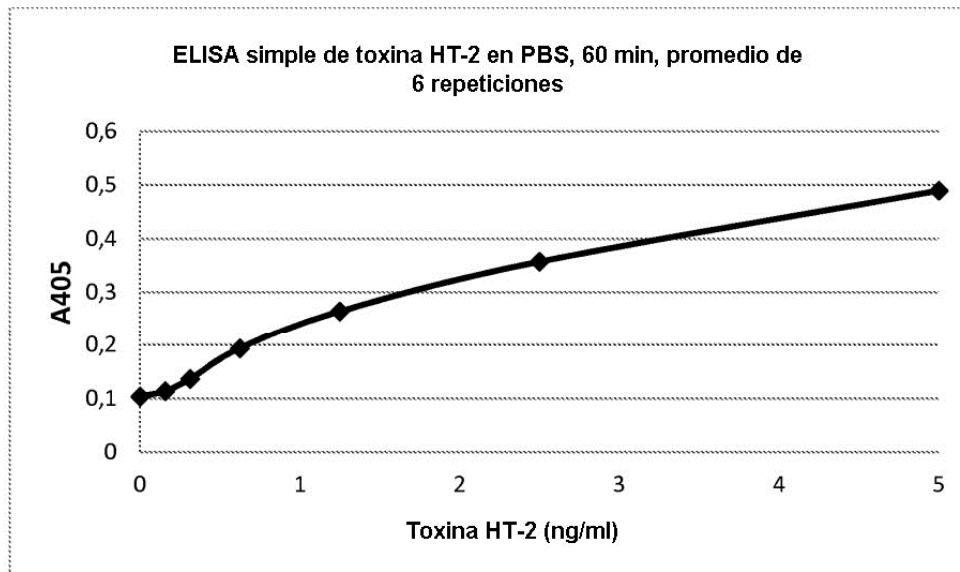


Fig. 13

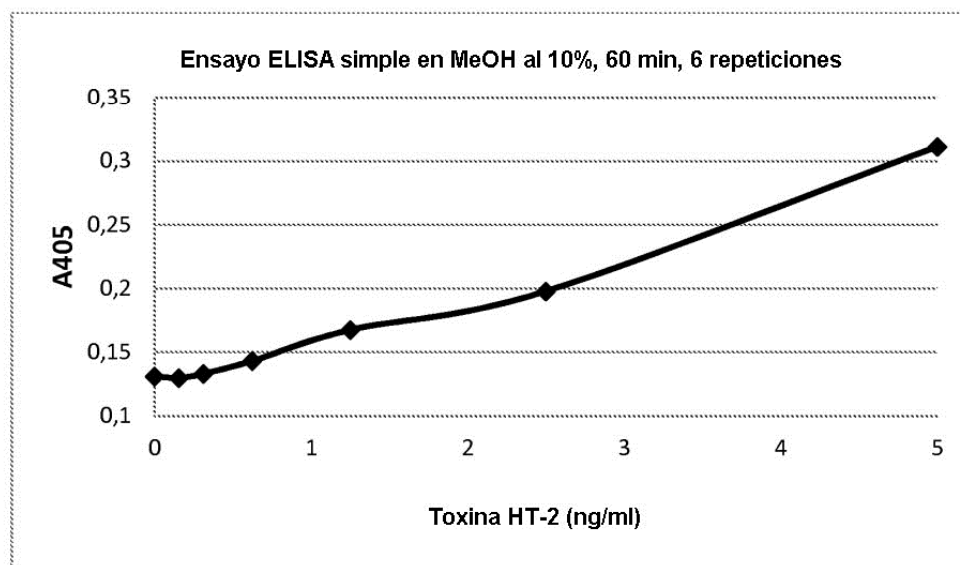


Fig. 14

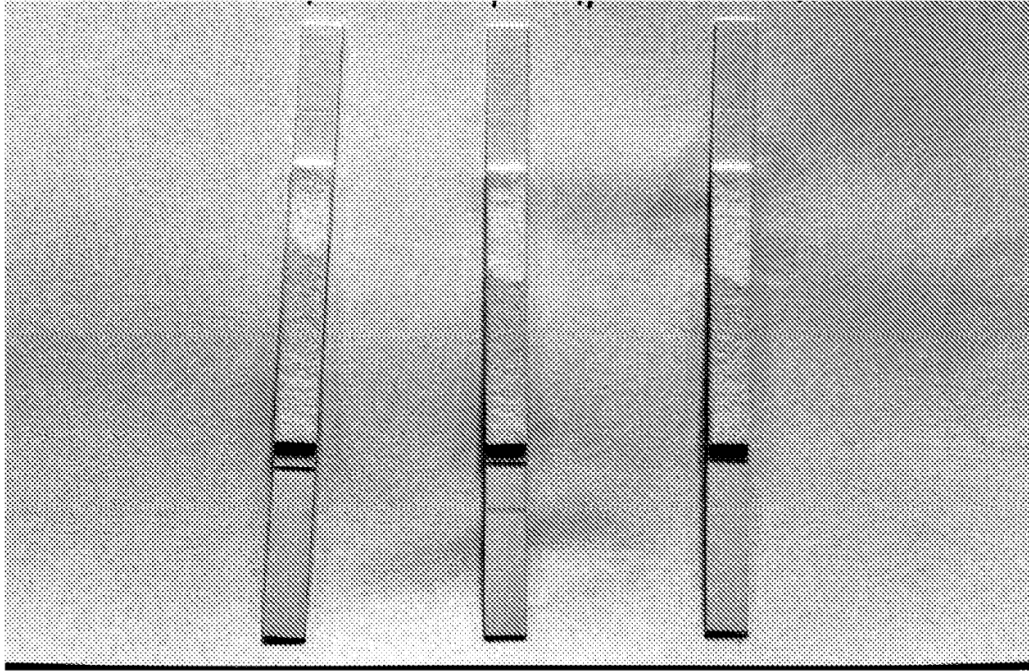


Fig. 15