

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 861**

21 Número de solicitud: 201200600

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

31.05.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.01.2014

Fecha de la concesión:

21.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**DE LOS SANTOS ÁLVAREZ, Noemi;
AMAYA GONZÁLEZ, Sonia;
MIRANDA ORDIERES, Arturo J. y
LOBO CASTAÑÓN, María Jesús**

54 Título: **Aptámeros específicos contra el gluten y método de detección del gluten asociado**

57 Resumen:

Aptámeros específicos contra el gluten y método de detección del gluten asociado.

La presente invención se refiere a unas moléculas de ADN de cadena sencilla, también denominadas aptámeros, capaces de reconocer y unirse específicamente al gluten, a un método de reconocimiento, captura y/o detección de gluten que emplea dichos aptámeros y a un kit que comprende dichos aptámeros.

ES 2 436 861 B2

DESCRIPCIÓN

APTÁMEROS ESPECÍFICOS CONTRA EL GLUTEN Y MÉTODO DE DETECCIÓN DEL GLUTEN ASOCIADO

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a unas moléculas de ADN de cadena sencilla, también denominadas aptámeros, capaces de reconocer y unirse específicamente al gluten, y a un método de reconocimiento, captura y/o detección de gluten que emplea dichos aptámeros. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el
10 campo de la biotecnología.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad celiaca es una enfermedad autoinmune de origen genético, que se
15 caracteriza por un proceso inflamatorio permanente del intestino delgado inducido por la ingestión de las proteínas de almacenamiento (gluten) del trigo (todas las especies denominadas *Triticum* como el trigo duro, espelta y kamut), la cebada, el centeno, sus variedades híbridas y probablemente la avena. Según los datos
20 actuales esta enfermedad tiene una prevalencia de aproximadamente el 1 por 100 de la población (S.K. Lee et al. 2006 Curr Opin Rheumatol 18, 101-107). La única terapia efectiva conocida se basa en seguir una dieta exenta de gluten de por vida, lo cual resulta complejo y costoso dado el uso masivo de estos cereales en la alimentación actual. Aunque la relación causal entre la ingesta de gluten y la enfermedad celiaca está perfectamente establecida, no está definida la relación
25 entre la cantidad de gluten ingerida y la gravedad de las manifestaciones clínicas. La variación individual así como la heterogeneidad clínica de los pacientes supone un problema para establecer valores umbral que permitan la protección de todos los individuos susceptibles, ya que incluso trazas de alimentos contaminados con gluten pueden ser perjudiciales para algunos celíacos.

30

Para satisfacer las necesidades de este sector de la población, la industria alimentaria ha desarrollado una gama de productos con limitadas cantidades de

gluten, ya que su supresión total en cereales que lo contienen naturalmente es técnicamente difícil y costosa. Además, existen otros productos que, aunque no contienen gluten de forma natural, pueden resultar contaminados durante su recolección, almacenamiento, procesamiento y/o transporte. La Unión Europea ha

5 homogeneizado las normas sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios destinados a este colectivo, basándose en las más recientes directrices de la Comisión del *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius ALINORM 08/31/REP, Appendix VII, p 107*), que indican un umbral de 20 ppm para alimentos denominados “exentos de gluten”, con el fin de que encuentren

10 alimentos adaptados a sus necesidades y nivel de sensibilidad.

Este valor es un compromiso entre la detectabilidad que alcanzan los métodos analíticos actuales basados en ensayos de afinidad con anticuerpos marcados con enzimas y la capacidad tecnológica para reducir la contaminación sin

15 aumentar los costes económicos y medioambientales. Desafortunadamente, este valor no es suficientemente seguro para muchos enfermos celíacos. En 1999, la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) creó la marca de garantía “Controlado por FACE” para aquellos productos que garanticen un valor máximo de 10 ppm, valor muy próximo a los límites de detección de los métodos

20 actuales.

Los métodos de análisis del gluten se basan en la detección directa de la proteína alergénica. El gluten está formado por cientos de proteínas caracterizadas por su alto contenido en prolina y glutamina y bajos contenidos en aminoácidos con

25 cadenas laterales cargadas. Tradicionalmente se subdivide en dos grandes fracciones según su solubilidad en alcohol:agua (60%): las solubles prolaminas (gliadina en trigo, hordeína en cebada, secalina en centeno, avenina en avena) y las insolubles gluteninas. Se han identificado diversos fragmentos tóxicos o inmunogénicos en las prolaminas que son resistentes a la digestión por proteasas

30 humanas (R. Ciccocioppo et al. 2005 Clin Exp Immunol 140, 408-416), aunque estudios recientes apuntan a que las gluteninas también son tóxicas (D.H. Dewar et al. 2006 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 18, 483-491). Shan et al. identificaron

un péptido de 33 aminoácidos en la α -2-gliadina (L. Shan et al. 2002 Science 297, 2275-2279) que resultó ser inmunodominante (L. Shan et al. 2005 J Proteome Res 4, 1732-1741). Hoy en día, los métodos estándar para la detección de gluten se basan en ensayos tipo ELISA, empleando diferentes anticuerpos que reconocen

5 diferentes epítomos de las prolaminas. Sin embargo, los resultados obtenidos dependen fuertemente del anticuerpo así como del material de referencia empleado (R. van Eckert et al. 2010 J. Cereal Sci. 51, 198-204). El anticuerpo denominado MAb 401.21 desarrollado en 1990 por Skeritt (J.H. Skeritt et al. 1990 J. Agric. Food Chem. 38, 1771-1778) y descrito en la patente australiana

10 AU572955, se comercializa en un ensayo tipo sándwich aprobado por la AOAC International (*"the scientific association dedicated to analytical excellence®"*, (J.H. Skeritt et al. 1991 J. AOAC 74, 257-264) descrito en las solicitudes de patente GB2207921, CA1294903 y AU1891788, aunque no es capaz de cuantificar hordeínas (detecta sólo un 4-5%), subestima el trigo duro y sobreestima el triticale

15 y las secalinas (T. Thompson et al. 2008 J. Am. Diet. Assoc. 108, 1682-1687). Tampoco detecta gluten parcialmente hidrolizado debido al formato tipo sándwich. Estudios recientes muestran que también reacciona contra gluteninas (R. van Eckert et al. 2010 J. Cereal Sci. 51, 198-204). Posteriormente se ha desarrollado el anticuerpo denominado R5, que reconoce el epítipo potencialmente tóxico

20 QQPFP y otras secuencias similares presentes en las prolaminas, incluido el 33-mer (L. Sorell et al. Febs Lett 439, 46-50; I. Valdes et al. 2003 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 465-474). El ensayo sándwich con el R5 ha sido designado como método tipo I por el Comité de métodos de análisis y muestreo del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius ALINORM 06/29/23, Appendix II, p.

25 40) y permite la detección de gluten en muestras naturales o procesadas con calor, previa extracción con una disolución que contiene reductores para eliminar los puentes disulfuro intercatenarios que se forman tras el calentamiento (E. Garcia et al. 2005 Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 17, 529-539) descrita en la patente española con número de publicación ES2182698 y familia de patentes

30 (EP1424345, US7585529). Sin embargo, este método no sirve para medir las prolaminas hidrolizadas. Se han desarrollado otros anticuerpos como el PN3 (H.J. Ellis et al. 1998 Gut 43, 190-195), el CDC5 (H.M. Nassef et al. 2008 Anal. Chem.

80, 9265-9271) y el G12 (B. Moron et al. 2008 Am. J. Clin. Nutr. 87 405-414; B. Moron et al. 2008 Plos One 3) contra los epítomos tóxicos o inmunogénicos comprendidos entre los aminoácidos 31-49, 56-75 y 57-89 de la α -gliadina, respectivamente.

5

Con el fin de detectar el gluten hidrolizado, se han propuesto ensayos competitivos, que requieren un único epítomo, y que han sido comercializados usando los anticuerpos R5 descritos en la patente española con número de publicación ES2304874 (ver también WO2008110655) y G12. Sin embargo, estos
10 métodos no son compatibles con el procedimiento de extracción anteriormente citado debido a que desnaturalizan los anticuerpos y marcadores enzimáticos durante la inevitable incubación entre la muestra y el único anticuerpo de detección usado.

15 Los aptámeros son un tipo de receptor molecular no proteico, son estables térmica y químicamente en condiciones extremas y, por tanto, constituyen una alternativa prometedora respecto a los anticuerpos. Los aptámeros son oligonucleótidos que se seleccionan *in vitro* mediante un método combinatorio denominado SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento
20 exponencial) y se caracterizan por presentar una gran afinidad y especificidad hacia un ligando determinado (A.D. Ellington et al. 1990 Nature 346, 818-822; C. Tuerk et al. 1990 Science 249, 505-510). La presencia del ligando puede inducir un cambio conformacional en el oligonucleótido que permite el reconocimiento molecular. Una vez conocida la secuencia del oligonucleótido, su síntesis es
25 química (no requiere el uso de animales), muy reproducible y barata.

El procedimiento SELEX consiste en encontrar la secuencia de mayor afinidad por un ligando en las condiciones experimentales deseadas entre la mayor cantidad posible de hebras diferentes ($\sim 10^{13}$ - 10^{15}) mediante un sistema iterativo de puesta
30 en contacto entre las hebras de ácido nucleico y el ligando, separación de las hebras con afinidad por el ligando y amplificación por PCR de las mismas. La selección de aptámeros contra proteínas se suele realizar empleando como diana

la proteína completa. Sin embargo, la obtención de aptámeros contra epítomos específicos de proteínas es también posible siguiendo varias estrategias (A.V. Kulbachinsky et al. 2007 Biochemistry-Moscow 72, 1505-1518). Una de ellas consiste en emplear la secuencia peptídica específica, mucho más corta que la

5 proteína completa. Se ha demostrado que los aptámeros así obtenidos son capaces de reconocer el péptido dentro de la proteína completa (D. Proske et al. 2002 Chembiochem 3, 717-725), aunque en algunos casos con menor afinidad (W. Xu et al. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7475-7480).

- 10 Aunque a priori podría pensarse que la selección de aptámeros es posible para cualquier ligando, hay una serie de prerequisites para tener altas probabilidades de encontrar un aptámero de alta afinidad y especificidad. Ligandos con grupos cargados positivamente, capaces de formar puentes de hidrógeno o estructuras aromáticas planas, son más favorables que los que tienen grupos cargados
- 15 negativamente y, especialmente, que los que tienen una fuerte naturaleza hidrofóbica (R. Stoltenburg et al. 2007 Biomolecular Engineering 24, 381-403). Aunque el reconocimiento del ARN/ADN de estructuras hidrofóbicas es conocido, es bastante raro (B.A. Gilbert et al. 1997 Bioorgan Med Chem 5, 1115-1122). La estrategia para facilitar la interacción de ácidos nucleicos con moléculas
- 20 hidrofóbicas podría ser el uso de nucleótidos modificados con grupos que le confieran hidrofobicidad, compatibles con las enzimas de amplificación (S.D. Jayasena 1999 Clin. Chem. 45, 1628-1650). Por tanto, no es evidente que la selección de aptámeros contra ligandos muy hidrofóbicos, como el péptido 33-mer empleado en esta invención, usando nucleótidos no modificados con grupos
- 25 hidrofóbicos, dé lugar a secuencias consenso de alta afinidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere en un primer aspecto a una molécula de ADN de
- 30 cadena sencilla caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención o del kit del segundo aspecto de la invención, para la detección del gluten.

- En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección
10 del gluten basado en la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 La presente invención supone una solución a la necesidad de detectar la presencia de gluten en muestras de productos alimentarios o de otro tipo que puedan provocar intolerancia en individuos celiacos.

- Los inventores de la presente invención han demostrado la utilidad de unas
20 secuencias de ADN de cadena sencilla, también llamados aptámeros, capaces de unir específicamente gluten, para la separación y/o detección de esta proteína.

- Una ventaja de la presente invención es que los aptámeros son moléculas que pueden ser modificadas fácilmente para unirlas a moléculas marcadoras, a
25 diferencia de los anticuerpos, y por tanto presentan una alta versatilidad a la hora de su detección. Además, los aptámeros son moléculas altamente estables, lo cual supone una gran ventaja a la hora de desarrollar ensayos *in vitro* para la detección del gluten. Es importante resaltar que los aptámeros son también mucho más baratos y fáciles de sintetizar que los anticuerpos, que son las
30 moléculas usadas actualmente para la detección del gluten.

La presente invención permite la detección de gluten a nivel de trazas, concretamente menos de 50 ppb (partes por billón) de gliadina patrón PWG pueden ser detectadas con seguridad.

- 5 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ADN de cadena sencilla caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten. Preferiblemente, dicho gluten es de trigo, cebada, centeno o avena. Más preferiblemente, dicho gluten es de trigo.
- 10 La expresión “molécula de ADN de cadena sencilla”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una única hebra de nucleótidos unidos, que a su vez están compuestos cada uno de ellos por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato. A diferencia del ADN que se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas
- 15 conexiones denominadas puentes de hidrógeno, el ADN de cadena sencilla presenta una única hebra. En la presente descripción, la expresión “molécula de ADN de cadena sencilla” y el término “aptámero” se usan indistintamente.

- 20 La expresión “reconoce y se une específicamente”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la capacidad de los aptámeros de la presente invención de interaccionar con el gluten de manera específica, es decir, de unirse con una determinada afinidad a dicha proteína y de no unirse a otras. Esta capacidad de los aptámeros de la invención de reconocer y unirse específicamente a gluten es similar a la de los anticuerpos.

25

- En la presente descripción, se entiende por gluten una proteína amorfa que se encuentra en la semilla de algunos cereales, como el trigo, el centeno, la cebada y la avena, combinada con almidón. El gluten representa un 80% de las proteínas del trigo. Cuando la harina de uno de estos cereales se mezcla con agua, dos
- 30 proteínas del grano pertenecientes al grupo de las prolaminas, las gliadinas y las gluteninas, se unen para formar una red proteica llamada gluten. Esta proteína genera en una pequeña parte de la población una enfermedad llamada celiaquía,

en la cual el sistema inmunológico responde dañando el intestino delgado de las personas que la ingieren al no poder digerirla. La gliadina parece ser la proteína que presenta el mayor problema en la enfermedad celiaca o intolerancia al gluten, es modificada por la transglutaminasa y presentada por el alelo DQ2 del complejo mayor de histocompatibilidad. Esto hace que cada vez que se consuma un alimento con gluten se produzca una reacción inmunológica que deteriora progresivamente el intestino, pudiéndose además complicar con episodios de dermatitis herpetiforme y otras patologías neurológicas, reumáticas, etc.

- 5
10
15
- En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a gliadina, hordeína, secalina o avenina. Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a gliadina. Los autores de la presente invención han demostrado la capacidad de los aptámeros de la presente invención de reconocer y unir específicamente gliadina, como muestra el ejemplo 5 y la figura 4B.

20

El término “gliadina”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una prolamina que forma parte de la porción proteica del gluten (soluble en etanol) de las semillas del trigo. Las prolaminas son proteínas que poseen grandes cantidades de prolina y ácido glutámico. Existen homólogos de la gliadina en la cebada (hordeína), el centeno (secalina) y algunas variedades de avena (avenina), lo que explica que dichos cereales puedan también provocar la enfermedad celiaca.

25

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de maíz, soja o arroz. Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de arroz. Los autores de la presente invención han demostrado que los aptámeros de la presente invención son incapaces de unir y detectar proteínas de arroz, lo cual implica la ventaja de

30

que no van a dar resultados de falsos positivos en ensayos de detección de gluten.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla reconoce y se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. El péptido con SEQ ID NO: 1 es el conocido como péptido 33-mer. En la presente descripción, se entiende por péptido 33-mer un péptido de la α -gliadina de trigo, que es resistente a proteasas y que se ha considerado como el iniciador primario de la respuesta inflamatoria al gluten en los enfermos celíacos. Así, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que el péptido 33-mer es el péptido del gluten más bioactivo (inmunodominante) que es reconocido por células T procedentes de donantes celíacos HLA-DQ2⁺. En la presente invención el péptido 33-mer se ha elegido como diana para la evolución de las moléculas de ADN de cadena sencilla (aptámeros), concretamente la secuencia entre los aminoácidos 57 y 89 de la gliadina, que corresponde a SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica X-GTCT-Y, donde X comprende entre 3 y 29 nucleótidos e Y comprende entre 7 y 33 nucleótidos. Preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende una secuencia nucleotídica que se selecciona de entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, dicha molécula se une a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación K_D igual o menor de 55 nM.

En la presente descripción, se entiende por constante de disociación K_D una constante que mide la afinidad con la que un ligando, en la presente invención la molécula de ADN de cadena sencilla, se une a una proteína, en la presente invención el gluten. La afinidad ligando-proteína depende de interacciones intermoleculares no covalentes entre dos moléculas como puentes de hidrógeno,

interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas. Cuanto menor sea la K_D , mayor será la afinidad con la que el aptámero se una al gluten.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de
5 ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7.

10 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende además una molécula marcadora. Preferiblemente, la molécula marcadora se selecciona de entre un fluoróforo, una enzima, un péptido, una nanopartícula, una molécula electroactiva, una digoxigenina y una biotina.

15

En la presente descripción, se entiende por molécula marcadora una molécula fácilmente detectable mediante distintos métodos, que puede por ejemplo tener receptores específicos o puede ser una enzima que cataliza una reacción detectable directa o indirectamente tras la adición de los correspondientes
20 sustratos para la detección de la molécula de ADN de cadena sencilla de interés.

El término “fluoróforo”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un compuesto químico fluorescente que emite luz tras su excitación. Un fluoróforo unido a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite por lo
25 tanto su detección. En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el fluoróforo se selecciona de entre fluoresceína, boro-dipirrometeno, cianina, naftaleno y rodamina y cualquiera de sus derivados.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la enzima se
30 selecciona de entre peroxidasa, fosfatasa alcalina, DNAsas y NADH deshidrogenasas.

El término “DNAzimas”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a ácidos nucleicos con actividad catalítica que pueden generar con dicha actividad un marcaje detectable asociado a la presencia de dicha DNAzima.

- 5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el péptido se selecciona de entre una polihistidina, un epítipo myc y un epítipo FLAG. Una polihistidina es un péptido de entre 2 y 12 histidinas, preferiblemente de 6 histidinas. Un epítipo myc es un péptido de 10 aminoácidos derivado del gen c-myc y que por ser altamente inmunogénico es fácilmente detectable mediante
10 anticuerpos, como por ejemplo el anticuerpo monoclonal llamada 9E10 del *Developmental Studies Hybridoma Bank*. Un epítipo FLAG es un octapéptido que también es altamente inmunogénico y por tanto fácilmente detectable mediante anticuerpos. Ambos epítipos son bien conocidos en el estado de la técnica.
- 15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la nanopartícula se selecciona de entre una nanopartícula metálica, nanopartícula semiconductor y micro o nanopartícula magnética.

- 20 El término “nanopartícula metálica”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un nanoobjeto con sus tres dimensiones en la nanoescala (entre 1 y 100 nm), formada por oro, plata, platino u otros metales, que unida a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite su detección a través de sus propiedades ópticas, electroquímicas o catalíticas.

- 25 El término “inmovilizado”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que el péptido 33-mer, la proteína inmunógena o la molécula de ADN de cadena sencilla de la invención pueden estar unidos a un soporte sin perder su actividad. El soporte puede ser la superficie de una placa de microtitulación, superficies de materiales conductores, micro y nanopartículas magnéticas, soportes de vidrio,
30 partículas de látex, nanotubos de carbono, entre otras.

El término “nanopartícula semiconductor”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un nanoobjeto con sus tres dimensiones en la nanoescala de material semiconductor, como por ejemplo sulfuros, seleniuros y telururos de Cd, Zn o Pb, que unido a la molécula de ADN de cadena sencilla de
5 interés permite su detección mediante sus propiedades ópticas o electroquímicas.

El término “micro o nanopartícula magnética”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una partícula microscópica con propiedades magnéticas, que unida a la molécula de ADN de cadena sencilla de interés permite su
10 detección mediante el cambio en las propiedades ópticas que tienen lugar tras la unión entre la proteína y la cadena de ADN así marcada. En la presente invención dicha nanopartícula se utiliza para la detección como molécula marcadora y también como soporte sólido para la inmovilización de la molécula de ADN de cadena sencilla, del péptido 33-mer o de la proteína inmunógena (gliadina o
15 gluten).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula electroactiva se selecciona de entre azul de metileno, ferroceno, antraquinona y tionina, y cualquiera de sus derivados, entre otras.

20

El término molécula electroactiva, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula que puede oxidarse o reducirse dentro de la ventana de potencial de un material electródico y que, por tanto, su presencia puede ser detectada mediante técnicas electroquímicas faradaicas bien conocidas
25 en el estado de la técnica.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula marcadora es biotina. La biotina es también conocida como vitamina H y es una molécula muy usada en biotecnología para marcar otras moléculas, por lo que se
30 conoce como biotinilación. Las proteínas avidina y estreptavidina se unen con una altísima afinidad y especificidad a la biotina, por lo que dicha molécula es un buen marcador.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula marcadora es digoxigenina. La digoxigenina es un hapteno y puede conjugarse a las moléculas de ADN de cadena sencilla de la presente invención como
5 marcador de las mismas, ya que puede ser detectado fácilmente mediante anticuerpos específicos anti-digoxigenina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la molécula de ADN de cadena sencilla comprende un cebador en cada uno de sus extremos
10 para su detección mediante PCR.

En la presente descripción, se entiende por cebador una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la amplificación de ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que
15 forma pares de bases complementarios a la hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar y amplificar la hebra molde. En la presente invención los cebadores se unen a los extremos de la molécula de ADN de cadena sencilla para su amplificación y detección mediante PCR. Los cebadores pueden estar marcados con biotina o el fluoróforo 6-
20 carboxilfluoresceína (6-FAM), o sin marcar.

En la presente descripción, se entiende por PCR la reacción en cadena de la polimerasa. Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.
25 Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN partiendo de cebadores que se unen en los extremos de las hebras, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y la unión del cebador y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las
30 polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. En la presente invención la PCR se emplea para la amplificación y posterior detección de la molécula de ADN de cadena sencilla unida al gluten, péptido 33-mer, péptido recombinante 33-mer o

péptido control. Existen varios tipos de PCR como la PCR a tiempo real, PCR-ELISA o PCR-ELOSA. La principal característica de la PCR a tiempo real o cuantitativa es que permite cuantificar la cantidad de ADN presentes en la muestra original o identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN
5 específicas a partir de su temperatura de fusión. La PCR-ELISA (reacción en cadena de polimerasa – ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica híbrida entre PCR y ELISA para la cuantificación de productos de ADN. En este ensayo los productos de PCR están marcados con una biotina y con un hapteno para permitir su captura sobre superficies con (estrept)avidina y posterior
10 cuantificación usando un anticuerpo contra el hapteno conjugado con una enzima. La PCR-ELOSA es una técnica muy similar a la PCR-ELISA, en la que los productos de PCR sólo están marcados con el hapteno, de manera que se hibridan con una sonda de captura inmovilizada y se cuantifica mediante la utilización de un anticuerpo contra dicho hapteno conjugado con un enzima.

15

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, al menos un enlace fosfodiéster de la molécula de ADN de cadena sencilla contiene al menos un oxígeno (O) sustituido por un azufre (S).

20 La expresión “enlace fosfodiéster”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un enlace covalente que se produce entre un grupo hidroxilo (OH^-) en el carbono 3' y un grupo fosfato (PO_4^{3-}) en el carbono 5' del azúcar ribosa de los nucleótidos de la molécula de ADN de cadena sencilla, formándose así un doble enlace éster. Para mejorar la resistencia de los
25 aptámeros frente a la degradación por nucleasas, se incluyen en la presente invención aptámeros modificados, en los cuales se ha sustituido al menos uno de los átomos de oxígeno que participan en el enlace fosfodiéster, por un átomo de azufre.

30 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende al menos una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención. Preferiblemente, dicho kit

además comprende un soporte sólido. Más preferiblemente, la molécula de ADN de cadena sencilla está anclada al soporte sólido. En una realización preferida, el kit comprende al menos dos aptámeros, uno de captura y otro de detección.

- 5 En una realización preferida, el kit además comprende el péptido con SEQ ID NO: 1 o gliadina o gluten, anclado al soporte sólido. Un kit de este tipo permitiría llevar a cabo un ensayo ELISA competitivo, que consistiría en la competición entre el gluten presente en la correspondiente muestra y el péptido SEQ ID NO: 1 inmovilizado sobre soportes sólidos por una cantidad fija y limitada de aptámero
- 10 en disolución previamente marcado y/o modificado como se ha descrito arriba.

Preferiblemente, dicho kit comprende además un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a gluten. El gluten tiene varias repeticiones de la SEQ ID NO: 1, es decir, tiene varios sitios de unión por los que tanto los aptámeros de la

15 invención como un anticuerpo específico podrían unirse al mismo tiempo. Por tanto, más de un aptámero o uno o varios aptámeros y uno o varios anticuerpos podrían usarse de manera combinada para la separación y/o detección de gluten.

El kit de la invención pueden comprender además, sin ningún tipo de limitación,

20 anticuerpos primarios conjugados o no conjugados, péptidos, cebadores marcados o sin marcar, tampones, anticuerpos secundarios conjugados, proteínas o péptidos patrones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc. Por otro lado, el kit de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios

25 para su puesta en marcha y optimización. El kit de la invención pueden contener además otras proteínas o péptidos que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la detección y/o cuantificación de la molécula de ADN de cadena sencilla de la invención.

30

El término "anticuerpo", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de

moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína gluten, con alguno de sus fragmentos o con otras moléculas indicadoras utilizadas en el proceso de detección.

5

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un uso de la molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención o del kit del segundo aspecto de la invención, para la detección del gluten. Como se demuestra en los ejemplos y figuras de la presente descripción, los aptámeros de la invención han probado ser útiles en la detección específica del gluten.

10

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección del gluten que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto una molécula de ADN de cadena sencilla del primer aspecto de la invención con una muestra problema; y
- b) detectar la presencia del complejo formado por dicha molécula y el gluten de la muestra problema en la etapa (a).

15

Se entiende por “muestra problema” cualquier muestra, ya sea una muestra alimentaria o de otro tipo, susceptible de contener gluten o fragmentos derivados del gluten que puedan provocar la intolerancia en un individuo celiaco.

20

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo en disolución.

25

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo en un soporte sólido.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante PCR.

30

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante un aptaensayo. El término "aptaensayo", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a ensayos de unión donde la molécula receptora que enlaza al gluten es una cadena de ADN sencilla o aptámero de forma completamente análoga a los inmunoensayos donde la molécula receptora es un anticuerpo. Por analogía con los inmunoensayos, en este término se incluyen toda la variedad de formatos conocidos para los inmunoensayos, sin más que sustituir anticuerpo por aptámero.

10 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante un inmunoensayo. Preferiblemente, dicho inmunoensayo se selecciona de entre *western blot*, *dot blot* o ELISA. Más preferiblemente, dicho inmunoensayo es un ELISA.

15 Los aptámeros de la presente invención pueden ser usados para capturar, concentrar y/o detectar gluten en disolución o anclados sobre superficies sólidas. Por ejemplo, para capturar y/o preconcentrar gluten se podrían usar los aptámeros biotinilados conjugados a un soporte sólido que contenga estreptavidina o alguna de sus variantes (micropartículas magnéticas, placas de microtitulación, etc) que permita su separación de la matriz que contenga el gluten.

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

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. A) Representación de la concentración de aptámeros de cada ciclo de selección que no se enlazan (gris oscuro) y que se enlazan (gris claro) al péptido con SEQ ID NO: 1 tras su interacción con el mismo durante 10 min en BS (tampón de enlace) obtenidas por fluorescencia. B) Evolución del porcentaje de enriquecimiento en secuencias de ADN de afinidad hacia el péptido con SEQ ID NO: 1 con las sucesivas rondas de selección.

FIG. 2. Estructura secundaria más estable de los aptámeros con A) SEQ ID NO: 2, B) SEQ ID NO: 5, C) SEQ ID NO: 7, D) SEQ ID NO: 8, E) SEQ ID NO: 9 y F) SEQ ID NO: 10, obtenidos mediante el servidor en red (*mfold*) de acceso libre, alojado por "The RNA Institute, College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany".

FIG. 3. Valoración calorimétrica de 33,4 μ M del aptámero con SEQ ID NO: 2 con 0,338 mM del péptido con SEQ ID NO: 1 en BS (50 mM TRIS pH 7,4+0,25 M NaCl+5 mM MgCl₂) a 15 °C (A) y 35 °C (B). Gráficas superiores: Potencia en función del tiempo obtenida tras cada adición de péptido. Gráficas inferiores: Valores integrados de la variación de calor en cada adición tras la corrección con el calor de dilución.

FIG. 4. Curvas de enlace de los aptámeros con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 a partículas magnéticas modificadas A) con el péptido con SEQ ID NO: 1 B) con el estándar de gliadina PWG (*Prolamin Working Group*).

FIG. 5. Curvas de enlace de los aptámeros con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 a partículas magnéticas modificadas con extractos etanólicos de harina de A) centeno (en porcentaje de fracción enlazada) y B) avena (en intensidad de corriente).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia de los aptámeros de la invención y del método de detección de gluten de la invención.

Ejemplo 1: Obtención de aptámeros para el péptido con SEQ ID NO: 1 de la α -2-gliadina.

10

Materiales

La diana seleccionada, el péptido con SEQ ID NO: 1, se obtuvo mediante técnicas de ADN recombinante. A partir de un oligonucleótido sintético (SEQ ID NO: 20) obtenido en Sigma-Genosys con la secuencia que codifica para los 33 aminoácidos que van desde la posición 57 a la 89 de la gliadina (Gen Bank, número de acceso AJ133612.1) y los cebadores directo (SEQ ID NO: 11) e inverso (SEQ ID NO: 12), se obtuvieron múltiples copias por PCR. El péptido recombinante fue obtenido tras clonar este producto de PCR y expresarlo en el sistema pETBlue-2, siguiendo las instrucciones del fabricante (Novagen), por el cual se le añade una cola de histidinas. Para la purificación del péptido con la cola de histidinas (SEQ ID NO: 13) se utilizó una columna HisTrap FF de 1 mL en un equipo AKTA FPLC (GE Healthcare). Para la contraselección se empleó la cola de histidinas (péptido control, SEQ ID NO: 14) obtenida con el sistema pETBlue-2.

25 La colección de secuencias de ADN de 80 nucleótidos fue diseñada de forma que su secuencia general corresponde a la SEQ ID NO: 15. La colección fue sintetizada y purificada por PAGE por Sigma-Genosys. Las secuencias de los cebadores empleados en la etapa de amplificación por PCR corresponden a SEQ ID NO: 16 (cebador directo) y SEQ ID NO: 17 (cebador inverso biotinilado). Para cada ronda se emplearon micropartículas magnéticas (MagneHis™ Ni particles, de Promega, USA) modificadas con el péptido diana o con el control. El protocolo

30

de modificación consistió en equilibrar las partículas en tampón de modificación (BM, 100 mM HEPES pH 7,5+10 mM imidazol+0,5 M NaCl). Después se incubaron con péptido con SEQ ID NO: 1 o con péptido control con SEQ ID NO: 14 en concentración comprendida entre 0,25 y 1 µg/µL en BM durante 15 min con rotación a temperatura ambiente. Tras decantar y lavar 2 veces con BM + 0,01% Tween-20 y 1 vez con tampón de enlace (BS: 50 mM TRIS pH 7,4+0,25 M NaCl+5 mM MgCl₂), las partículas magnéticas modificadas fueron diluidas a 5 pmol de diana/µL en BS.

10 Procedimiento

Para cada ronda de selección se usaron 250 pmoles de la colección de ADN seleccionada y amplificada en la ronda anterior (1 nmol de la colección inicial en la primera ronda para asegurar una variedad de secuencias de 5×10^{14} - 1×10^{15} moléculas) diluidos en BS. Se calentaron a 98 °C durante 4 min e inmediatamente se enfriaron en hielo otros 4 min. El medio de selección consistió en BS al que se le añadió 1 µg/mL de BSA (albúmina de suero bovino) para evitar uniones inespecíficas y un ARN transferente competidor en una concentración 10 veces inferior a la de la colección de ADN. En este medio se pusieron en contacto las moléculas de ADN con una concentración de péptido (péptido con SEQ ID NO: 1 o péptido control con SEQ ID NO: 14 en las contraselecciones) 10 veces inferior a la de ADN para limitar la cantidad de diana y favorecer la competición. Tras un tiempo de incubación que fue disminuyendo progresivamente en las rondas sucesivas según la tabla 1, se hicieron varios lavados en BS+0,01 Tween-20 (ver tabla 1).

25

Finalmente se eluyó el complejo ADN-péptido incubando las partículas en 100 mM HEPES pH 7,5+500 mM imidazol (BME) durante 10 min bajo agitación. El eluato fue transferido a tubos de PCR para proceder a su amplificación. Cada 100 µL de PCR contenía: 2 µL de molde (eluato), 1 µM de cada cebador (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17), 0,2 mM de dNTP, 3 mM de Mg²⁺, 1x buffer PCR y 2,8 U de *inmolase DNA polymerase* (Disbiotec). Las condiciones de PCR fueron: incubación inicial a 37 °C durante 10 min, 20 min a 95 °C para activar la enzima y

15 ciclos de 94 °C- 57 °C- 72 °C durante 45 s cada uno. La extensión final fue realizada a 72 °C durante 10 min. La amplificación fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La cuantificación del ADN de cadena doble amplificado se realizó fluorimétricamente con un "MiniFluorímetro" modelo 5 TBS-380 de la casa Turner Biosystems. La obtención de la hebra de ADN de cadena simple se logró usando partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Life Technologies, Madrid). Estas partículas se pusieron en contacto con el ADN durante 15 min a temperatura ambiente y bajo rotación tras lo cual, se procedió a la separación de 10 las hebras por incubación en NaOH 100 mM durante 10 min bajo agitación. El sobrenadante resultante contiene el ADN de cadena simple que se emplea en la siguiente ronda.

15 Tabla 1. Condiciones experimentales variables empleadas en las sucesivas rondas de la selección.

Ronda	Contraselección	Tiempo de incubación (min)	Número de lavados
1		60	2
2		60	2
3	si	60	2
4		30	2
5		30	5
6	si	30	5
7		15	5
8		15	10
9	si	15	10
10		15	15

Antes de las rondas 3, 6 y 9 se procedió a hacer una contraselección incubando el ADN de la ronda anterior con partículas magnéticas modificadas con el péptido 20 control con SEQ ID NO: 14 en las mismas condiciones que con el péptido con

SEQ ID NO: 1, pero en este caso se desecharon las partículas y se usó el sobrenadante en la correspondiente ronda de selección.

Tras 10 rondas de selección, el 12,8% del ADN seleccionado fue capaz de unirse al péptido recombinante, mientras que no se detectaron secuencias que se uniesen al péptido control. El porcentaje de unión se determinó con alícuotas de cada ciclo amplificadas por PCR en las mismas condiciones experimentales que en cada ciclo salvo que se empleó un cebador directo con SEQ ID NO: 16 marcado con 6-FAM (SEQ ID NO: 18). La hebra marcada con 6-FAM fue separada de la marcada con biotina de manera idéntica a la separación de hebras previa a cada ronda y su concentración fue determinada fluorimétricamente (Biotek Instrument flx800) frente a un calibrado realizado con secuencias aleatorias de ADN-6-FAM de concentración conocida empleando una λ de excitación de 480 nm y una λ de emisión de 528 nm.

15

El ensayo de unión se realizó poniendo en contacto cantidades equimolares de ADN-6-FAM de cada ciclo y péptido recombinante (SEQ ID NO: 13) inmovilizados sobre partículas magnéticas (15 pmoles) durante 10 minutos en BS. La fracción no enlazada se recogió y tras 2 lavados en BS + 0,01% Tween-20, se eluyeron los aptámeros enlazados en BME durante 10 min bajo agitación, obteniendo así la fracción enlazada. Ambas fracciones fueron analizadas fluorimétricamente (figura 1A), observándose una progresiva disminución de la fracción no enlazada con los ciclos simultáneamente a un aumento de la fracción enlazada (figura 1B). Se realizó un ensayo de unión con el péptido control y las secuencias de ADN obtenidas en el ciclo 10. La fluorescencia emitida por la fracción no enlazada fue inferior al límite de detección, lo que indica que no se amplificaron secuencias con afinidad por la cola de histidinas ni por el soporte sólido.

30

Ejemplo 2: Identificación de los aptámeros de ADN obtenidos.

Para identificar los aptámeros con afinidad por el péptido SEQ ID NO: 1 se procedió a amplificar una alícuota del ciclo 10 usando los cebadores no modificados (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 19) usando las mismas condiciones que en anteriores etapas de amplificación, y se clonó utilizando el sistema

5 pETBlue-1 Acceptor Vector Kit de la casa Novagen. Tras clonarlo se sembraron placas de la cepa huésped (Nova Competent cells, Novagen) y se secuenciaron 25 clones utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y un equipo Abi PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software Chromas Lite 2.01.

10

Se determinó la estructura secundaria de los seis aptámeros SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 usando el servidor en red "mfold" en las condiciones de enlace (25 °C, 250 mM de NaCl y 5 mM de MgCl₂). En la figura 2 y en la tabla 2 se muestra la estructura más

15 estable y las energías libres de Gibbs para cada uno de los aptámeros, respectivamente.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de los aptámeros.

Aptámero	ΔG (kcal mol ⁻¹)
SEQ ID NO: 2	-1.24
SEQ ID NO: 5	-3.21
SEQ ID NO: 7	-1.72
SEQ ID NO: 8	-3.06
SEQ ID NO: 9	-2.95
SEQ ID NO: 10	-4.11

20 Ejemplo 3: Caracterización del aptámero SEQ ID NO: 2.

El aptámero con SEQ ID NO: 2 se seleccionó para su posterior caracterización mediante valoración calorimétrica isoterma. Se empleó como molécula diana el péptido SEQ ID NO: 1 sintetizado químicamente por Biomedal (Sevilla, España). El enlace del aptámero con SEQ ID NO: 2 al péptido SEQ ID NO: 1 fue estudiado mediante valoración calorimétrica isoterma. La concentración del aptámero en la celda calorimétrica fue de 33,4 μM , mientras que la concentración de péptido en la jeringa fue de 0,338 mM. Se realizó la siguiente serie de inyecciones de péptido: una primera inyección de 4 μL seguida de 18 inyecciones de 15 μL . En la figura 3 se muestran las valoraciones a ambas temperaturas 15 ° C y 35 ° C. El análisis de las medidas han proporcionado los valores termodinámicos resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos hallados por ITC.

	15° C	35° C
Constante de enlace, K_B	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^7$	$(6 \pm 2) \times 10^7$
Constante de disociación, K_D	45 ± 10 nM	17 ± 10 nM
Cambio de energía libre de enlace, ΔG_B	-10,0 kcal mol ⁻¹	-10,6 kcal mol ⁻¹
Cambio de entalpía de enlace, ΔH_B	$+0,70 \pm 0,01$ kcal mol ⁻¹	$+0,57 \pm 0,01$ kcal mol ⁻¹
Cambio de entropía de enlace, ΔS_B	$+36,0$ cal/(K mol ⁻¹)	$+37,4$ cal/(K mol ⁻¹)

- La K_D fue determinada mediante valoración calorimétrica isoterma (ITC), técnica habitual para este tipo de medidas. El aptámero fue valorado mediante adiciones sucesivas de péptido SEQ ID NO: 1 sintetizado químicamente, a 15 y 35 °C, obteniéndose unas K_D de 45 ± 10 nM y 17 ± 10 nM, respectivamente.
- Estos datos confirman la unión entre el aptámero con SEQ ID NO: 2 objeto de la invención y el péptido SEQ ID NO: 1. Además el aptámero con SEQ ID NO: 2 presenta una gran afinidad por la diana, como se deduce de una constante de

disociación nM para una molécula hidrofóbica, que no contiene los grupos funcionales que favorecen la interacción con los ácidos nucleicos.

Ejemplo 4 Curvas de enlace de los aptámeros seleccionados al péptido con SEQ

5 ID NO: 1.

La evaluación de la afinidad de los aptámeros por el péptido con SEQ ID NO: 1 se realizó mediante ensayos de unión sobre partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, sobre los que se inmovilizó el péptido con SEQ ID NO: 1
10 biotinilado en su extremo C terminal. La fracción de cada uno de los seis aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronoamperométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂). Todos los aptámeros seleccionados presentaron afinidad por la diana.

15

Para ello se modificaron partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Life Technologies, Madrid) con péptido SEQ ID NO: 1 biotinilado en su extremo C terminal (Biomedal, Sevilla) 2 µM en PBS + 0,01 % Tween-20 durante toda la noche. Tras dos lavados con PBS + 0,01
20 % Tween-20, se bloquearon con 500 µM de biotina en PBS + 0,01 % Tween-20 durante 30 min. Tras 2 nuevos lavados se reconstituyeron en BS. Se pusieron en contacto concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros biotinilados (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10) en BS durante 30 min. Tras 2 lavados con BS + 0,01 % Tween-
25 20, se añadieron 2,5 µg/mL estreptavidina-HRP de Sigma-Aldrich durante 30 min. Tras 3 lavados con BS + 0,01 % Tween-20, una alícuota se colocó sobre un electrodo serigrafiado de carbono (Dropsens, Oviedo) y se añadió el sustrato. Tras 1 minuto de reacción enzimática se midió cronoamperométricamente a 0 V la cantidad de producto generado usando un potenciostato µ-AutoLab tipo II PGstat-
30 12 equipado con el software GPES 4.9 (EcoChemie, Holanda). En la figura 4A se observa que todos los aptámeros presentan afinidad por la diana (péptido SEQ ID NO: 1).

Ejemplo 5 Curvas de enlace de los aptámeros seleccionados a PWG.

Se realizó la evaluación de la afinidad de los aptámeros por el patrón de gliadina comúnmente usado en los inmunoensayos comerciales obtenido a partir de una mezcla de harinas de trigo de diferente procedencia, denominado PWG. Se llevaron a cabo ensayos de unión sobre partículas magnéticas activadas con grupos tosilo superficiales, sobre los que se inmovilizó el PWG. La fracción de cada uno de los seis aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronoamperométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂).

Para ello se modificaron partículas magnéticas con grupos tosilo superficiales (Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated, Life Technologies, Madrid) con PWG (estándar de gliadina de *Prolamin Working Group*) en 0,32 mg/mL en Borato 0,058 M pH 9,5 +(NH₄)₂SO₄ 1M durante 24 h a 37 °C. Tras dos lavados en PBS +0,01 % Tween-20, se dejan en el mismo tampón durante la noche a 37 °C. Tras 2 nuevos lavados se reconstituyeron en PBS +0,01 % Tween-20 y se utilizaron para la obtención de las curvas de enlace. Para ello alícuotas idénticas de las micropartículas modificadas con PWG se pusieron en contacto con concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros biotinilados (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9) en BS + 0,01 % Tween-20 durante 30 min. Tras 2 lavados con BS +0,01 % Tween-20, se añadieron 2,5 µg/mL estreptavidina-HRP de Sigma-Aldrich y se incubó durante 30 min. Tras 2 lavados con BS + 0,01 % Tween-20 y uno en BS, se resuspendieron en BS. Una alícuota se colocó sobre un electrodo serigrafiado de carbono (Dropsens, Oviedo) y se añadió el sustrato. Tras 1 minuto de reacción enzimática se midió cronoamperométricamente a 0 V la cantidad de producto generado usando un potenciostato µ-AutoLab tipo II PGstat-12 equipado con el software GPES 4.9 (EcoChemie, Holanda). En la figura 4B se observa que todos los aptámeros presentan afinidad por la proteína gliadina completa, como cabe esperar tras la exigente selección efectuada mediante SELEX.

Ejemplo 6: Especificidad de la interacción.

Se evaluó la especificidad de la afinidad de los aptámeros hacia otras proteínas susceptibles de desencadenar la enfermedad celíaca y se evaluó su reactividad cruzada con otras proteínas presentes en cereales que no la desencadenan. Se llevaron a cabo ensayos de unión sobre partículas magnéticas activadas con grupos tosilo superficiales, sobre los que se inmovilizó un extracto etanólico diluido de harinas de centeno, avena y arroz. La fracción de cada uno de los aptámeros modificados con biotina que se une a dichas partículas fue medida cronoamperométricamente tras adición del conjugado de estreptavidina-HRP y del sustrato de la enzima (tetrametilbencidina + H₂O₂) (Figura 5).

Para ello, se realizaron curvas de enlace de los aptámeros con secuencias SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 8, hacia las prolaminas de otros cereales que provocan la enfermedad celíaca (centeno y posiblemente avena) y otros que no la ocasionan (arroz). La extracción de 1 g de cada harina se realizó con 10 mL de etanol al 60% durante 30 min bajo agitación, tras lo cual se centrifugó a 2500 g durante 45 min. El extracto volvió a ser centrifugado y el sobrenadante resultante recogido para su uso. Se modificaron partículas magnéticas tosiladas de la forma indicada en el ejemplo 5 y se realizaron las curvas de enlace de manera totalmente análoga. En la figura 5 se observa que todos los aptámeros ensayados tienen afinidad por el centeno, aunque menor que por el trigo. Como se muestra en la figura 5B el aptámero SEQ ID NO: 7 muestra afinidad por la avena, aunque a concentraciones más elevadas que para el trigo y el centeno, por lo que es capaz de reconocer las aveninas, cuyo papel en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca no está aún completamente esclarecido. El aptámero SEQ ID NO: 2 no mostró afinidad por las proteínas de arroz puesto que las señales amperométricas obtenidas son indistinguibles del blanco.

30

REIVINDICACIONES

- 1.- Una molécula de ADN de cadena sencilla, donde dicha secuencia reconoce y se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia aminoacídica
5 SEQ ID NO:1.
- 2.- La molécula de ADN según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha molécula reconoce y se une específicamente al gluten.
- 10 3.- La molécula de ADN según la reivindicación 2, donde dicho gluten es de trigo, cebada, centeno o avena.
- 4.- La molécula de ADN según la reivindicación 3, donde dicho gluten es de trigo.
- 15 5.- La molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde dicha molécula reconoce y se une específicamente a gliadina, hordeína, secalina o avenina.
- 6.- La molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde
20 dicha molécula reconoce y se une específicamente a gliadina.
- 7.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicha secuencia es incapaz de reconocer y unir específicamente proteínas de
25 maíz, soja o arroz.
- 8.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica X-GTCT-Y, donde X
30 comprende entre 3 y 29 nucleótidos e Y comprende entre 7 y 33 nucleótidos.
- 9.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha secuencia comprende una secuencia nucleotídica que se selecciona de

entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

10.- La secuencia de ADN según la reivindicación 9, donde dicha secuencia se une a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación K_D igual o menor de 55 nM.

11.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

10

12. La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde dicha secuencia comprende la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7.

13.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicha secuencia comprende además una molécula marcadora.

20

14.- La secuencia de ADN según la reivindicación 13, donde dicha molécula marcadora se selecciona de entre un fluoróforo, una enzima, un péptido, una nanopartícula, una molécula electroactiva, una digoxigenina y una biotina.

15.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha molécula electroactiva se selecciona de entre azul de metileno, ferroceno, antraquinona y tionina.

25 16.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicho fluoróforo se selecciona de entre fluoresceína, boro-dipirrometeno, cianina, naftaleno y rodamina.

30 17.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha enzima se selecciona de entre peroxidasa, fosfatasa alcalina, DNAsas y NADH deshidrogenasas.

18.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde el péptido se selecciona de entre una polihistidina, un epítipo myc y un epítipo flag.

19.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde dicha nanopartícula
5 se selecciona de entre una nanopartícula metálica, nanopartícula semiconductor y micro o nanopartícula magnética.

20.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde la molécula
10 marcadora es biotina.

21.- La secuencia de ADN según la reivindicación 14, donde la molécula
15 marcadora es digoxigenina.

22.- La secuencia de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde
al menos un enlace fosfodiéster de dicha secuencia contiene al menos un O
sustituido por un S.

23.- Un kit para la detección de gluten caracterizado por que comprende al menos
una secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 22.

24.- El kit según la reivindicación 23, caracterizado por que además comprende
un soporte sólido.

25.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde la secuencia de
ADN está anclada al soporte sólido.

26.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, que además
comprende el péptido con SEQ ID NO: 1 o gliadina o gluten, anclado al soporte
30 sólido.

27.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, donde además comprende un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a gluten.

28.- Uso de la secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o del kit según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, para la detección del gluten.

29.- Un método de detección del gluten que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto una secuencia de ADN de cadena sencilla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 con una muestra problema; y
- b) detectar la presencia del complejo formado por dicha secuencia y el gluten de la muestra problema en la etapa (a).

30.- El método según la reivindicación 29, donde la etapa (a) se lleva a cabo en disolución.

31.- El método según la reivindicación 29, donde la etapa (a) se lleva a cabo en un soporte sólido.

32.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante PCR.

33.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante un aptaensayo.

34.- El método según la reivindicación 33, donde el aptaensayo es un ELOSA.

FIG.1A

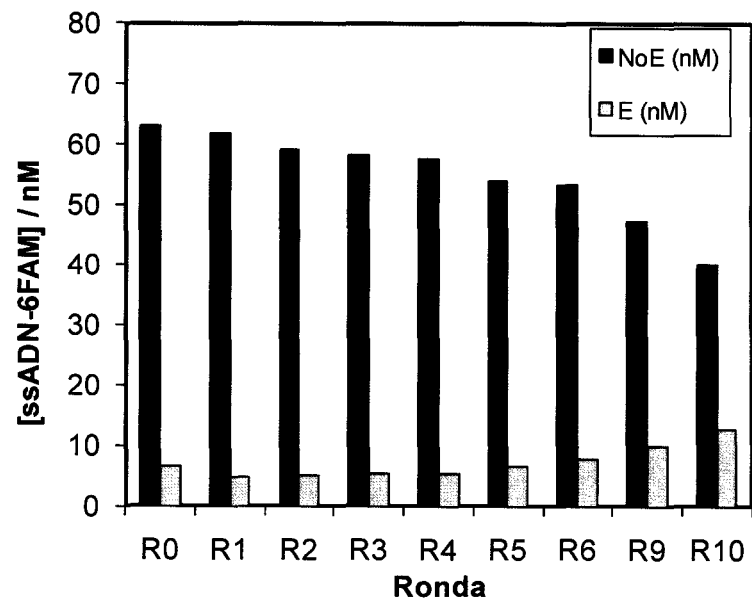


FIG. 1B

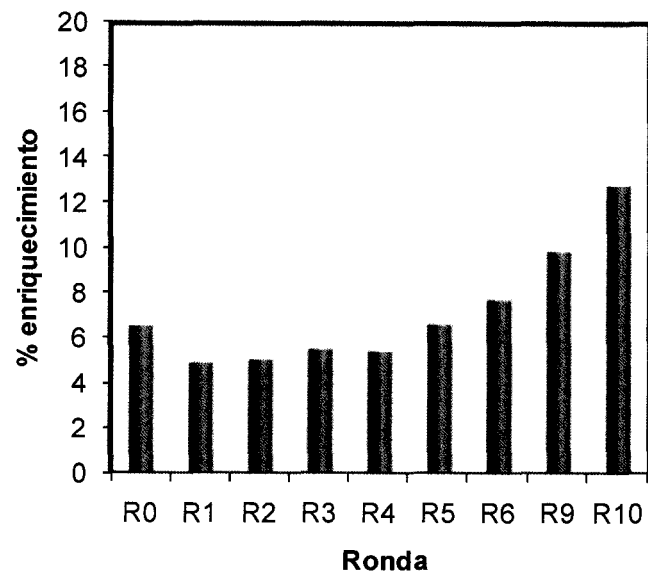


FIG.2A

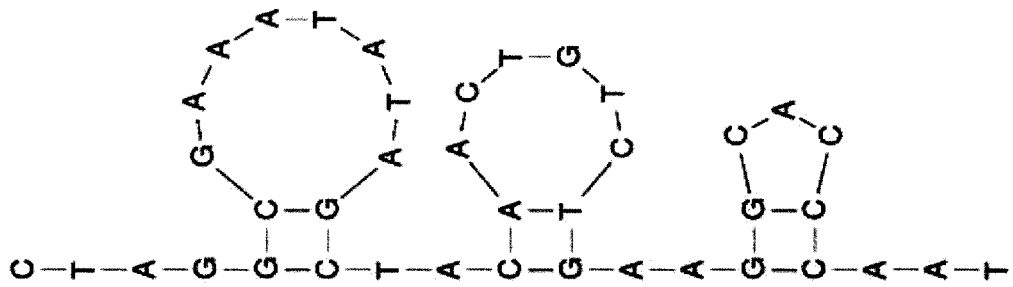


FIG.2B

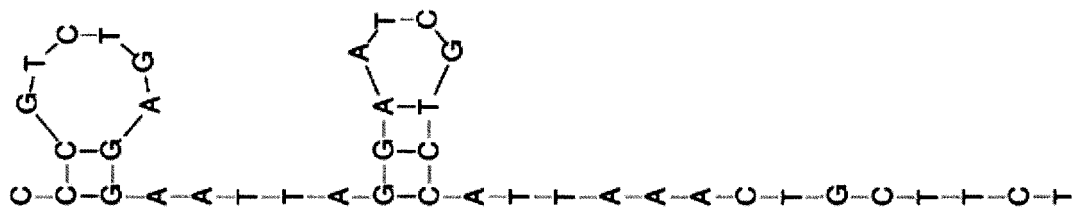


FIG.2C

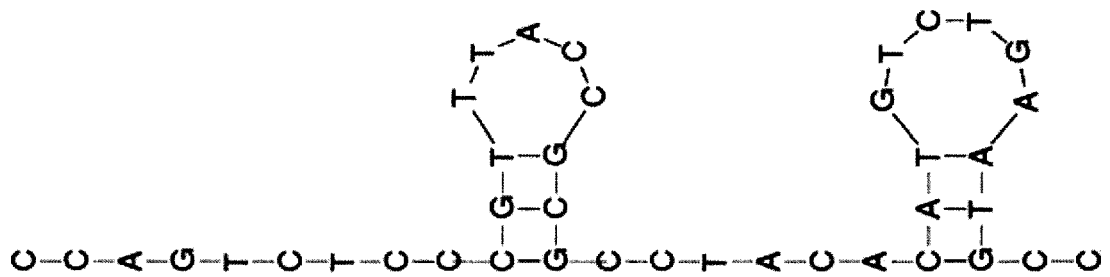


FIG.2D

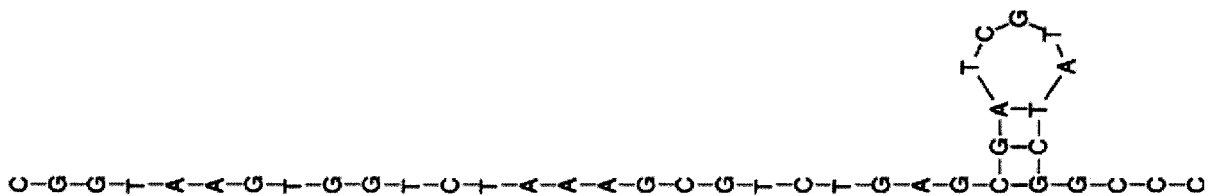


FIG. 2E

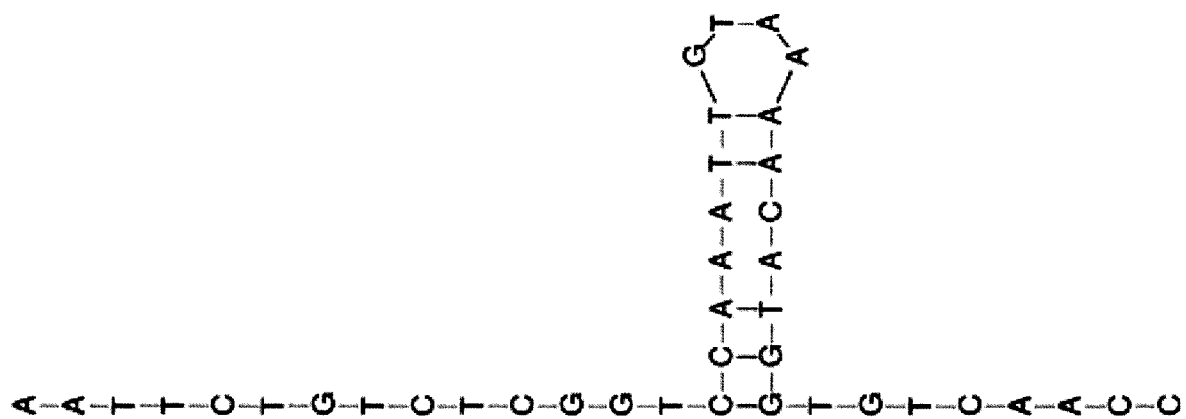


FIG. 2F

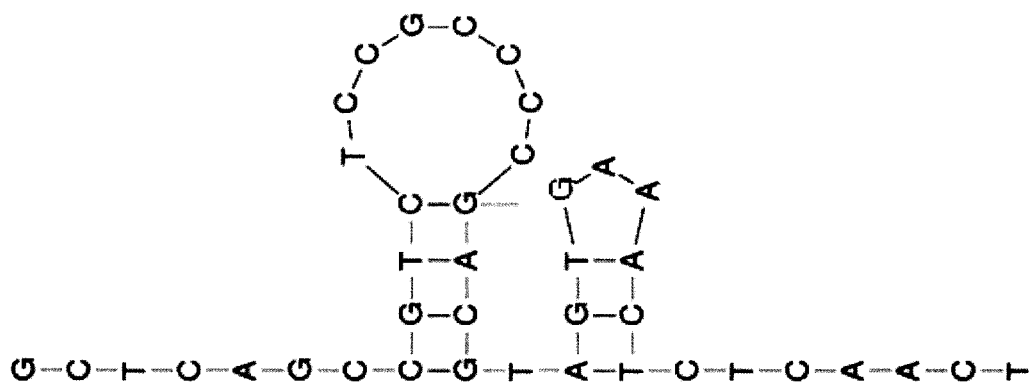


FIG.3

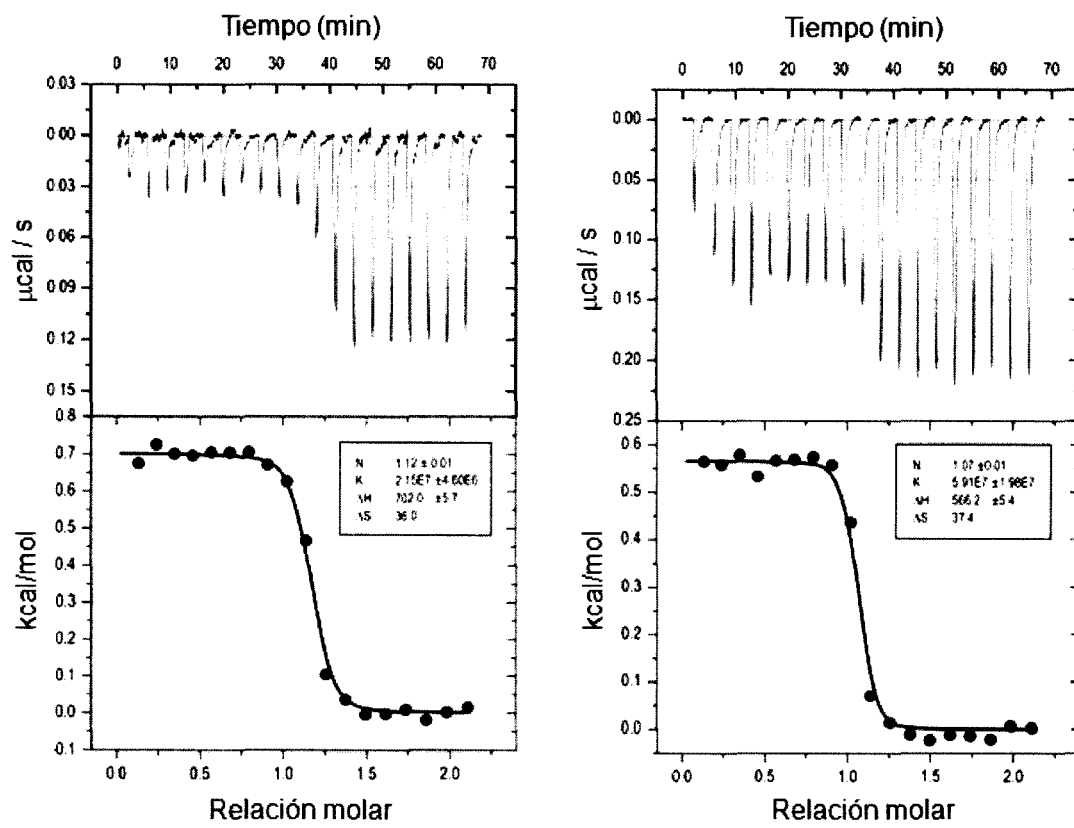


FIG.4A

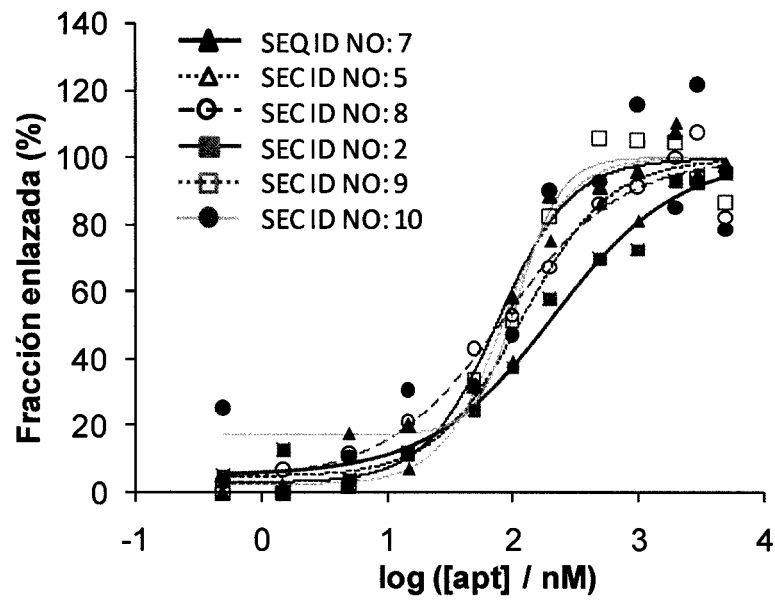


FIG.4B

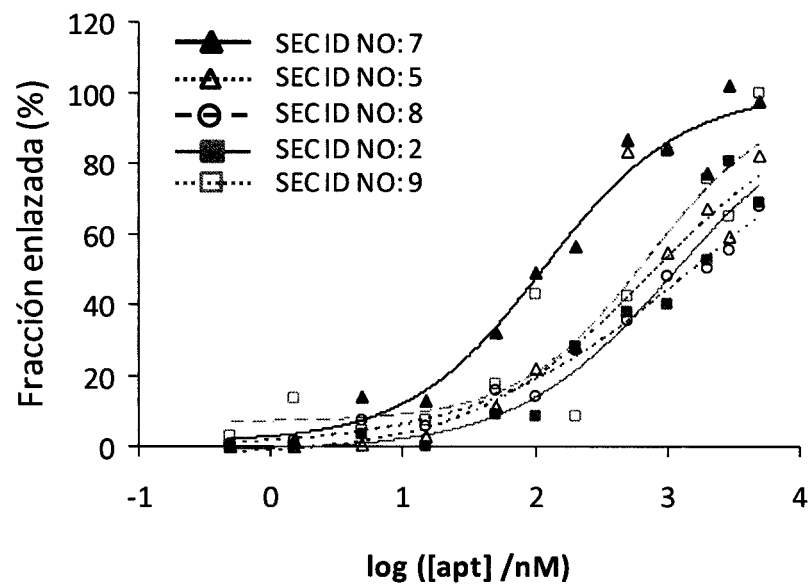


FIG.5A

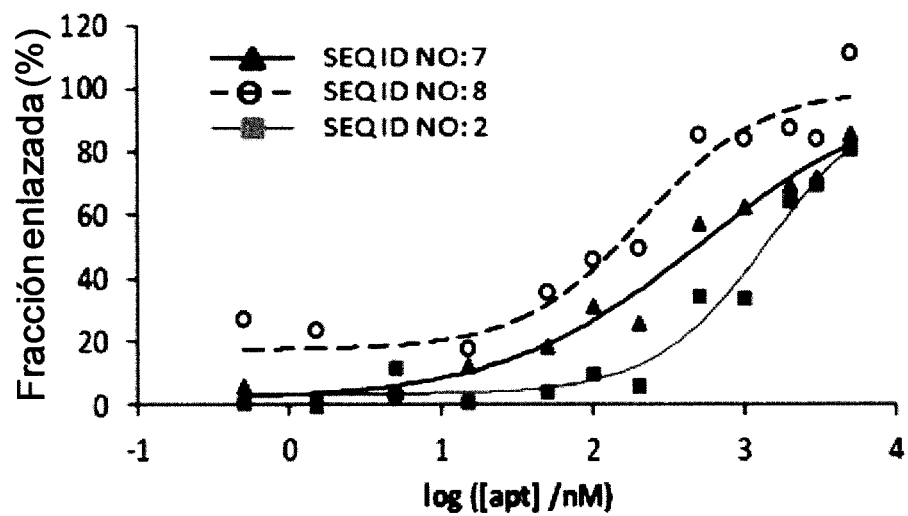
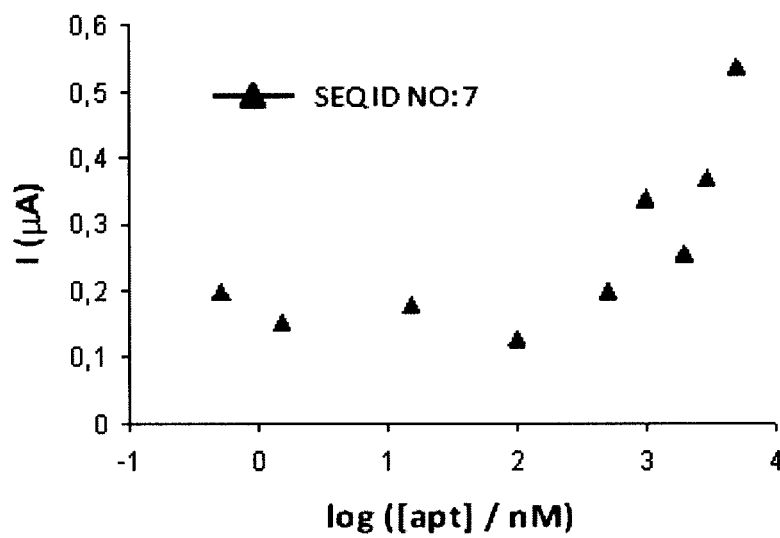


FIG.5B



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de oviedo
 <120> APTÁMERO ESPECÍFICOS CONTRA EL GLUTEN Y MÉTODO DE DETECCIÓN DEL GLUTEN ASOCIADO
 <130> ES1624.4
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 <400> 1

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
 20 25 30

Phe

<210> 2
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1.

<400> 2
 ctaggcgaaa tatagctaca actgtctgaa ggcacccaat 40

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 3
 ctaggcgaga tatagctaca actgtctgaa ggcacctaata 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 4
 actgtctgaa ggtaatgctg gcattgactc tgcaacaatc 40

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1
 <400> 5
 cccgtctgag gaattaggaa tcgtccatta aactgcttct 40

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1
 <400> 6
 ccccgtagca atgaccagta atgtgtctcg aaccttaaat 40

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1
 <400> 7
 ccagtctccc gttaccgcg cctacacatg tctgaatgcc 40

<210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1
 <400> 8
 cggtaatgg tctaaagcgt ctgagcgatc gtatcgggcc 40

<210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1
 <400> 9
 aattctgtct cggtccaaat tgtaaaacat ggtgtcaacc 40

<210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial que une específicamente SEQ ID NO: 1

<400> 10
gctcagccgt ctccgccccg acgtagtga actctcaact 40

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo clonación

<400> 11
gctgcagctg caaccatttc 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso clonación

<400> 12
ataaatggtt gcggctgcgg at 22

<210> 13
<211> 91
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido recombinante 33-mer con cola de histidinas

<400> 13

Met Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
20 25 30

Pro Phe Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala Arg
35 40 45

Leu Gln Asp Val Asp Gly Thr Ile Asp Thr Arg Ser Lys Leu Ala Ala
50 55 60

Ala Gln Leu Tyr Thr Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Asp Leu Glu His His His His His His
85 90

<210> 14
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido control: Cola de histidinas del péptido recombinante
33-mer

<400> 14

Met Ile Ser Arg Glu Leu Val Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala Arg Leu
1 5 10 15

Gln Asp Val Asp Gly Thr Ile Asp Thr Arg Ser Lys Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Gln Leu Tyr Thr Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Asp Leu Glu His His His His His His
50 55

<210> 15

<211> 80

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Colección de ADN inicial

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(60)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 15

agggttgata ggtaagagc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

cgatgtcaac tagctgttg 80

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo amplificación

<400> 16

agggttgata ggtaagagc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso biotinilado

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(1)

<223> biotina-(CH₂)₆-

<400> 17

ccaacagcta gttgacatcg 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo marcado con 6-FAM

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-FAM

<400> 18
 aggggtgata ggttaagagc 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso amplificación

<400> 19
 ccaacagcta gttgacatcg 20

<210> 20
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 20
 gctgcagctg caaccatttc cgcagccgca actaccatat ccgcagccgc aactaccata 60

tccgcagccg caactaccat atccgcagcc gcaaccattt 100



- ②① N.º solicitud: 201200600
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
C07H21/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SHAN L. et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. Science. 2002. Vol. 297, páginas 2275-2279, todo el documento.	1-34
A	LEE JF. et al. Aptamer therapeutics advance. Current Opinion in Chemical Biology. 2006. Vol. 10, páginas 282-289.	1-34
A	WO 2006051145 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]) 18.05.2006, página 2, línea 10 – página 3, línea 12.	1-34
A	WO 2008110655 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]) 18.09.2008, resumen.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C07H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SHAN L. et al. 2002. Vol. (297), páginas: 2275-2279.	2002
D02	LEE JF. et al. Current Opinion in Chemical Biology. 2006. Vol. (10), páginas: 282-289.	2006
D03	WO 2006051145 A1	18.05.2006
D04	WO 2008110655 A1	18.09.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una molécula de ADN de cadena sencilla, preferentemente que contenga las secuencias definidas como SEQ ID NO: 2-10, como aptámero capaz de reconocer y de unirse específicamente al péptido definido como SEQ ID NO: 1 o al gluten, pudiendo ir unida a una molécula marcadora (reivindicaciones 1-22). Se refiere también a un kit y a su uso en un método para detección de gluten en una muestra problema (reivindicaciones 23-34).

El documento D01 divulga un péptido de 33 aminoácidos de la alfa-gliadina, proteína que constituye uno de los principales componentes tóxicos del gluten, y su relación con el inicio de la respuesta inflamatoria del gluten en pacientes celíacos; sugiriendo también su uso en terapia para tratamiento de dicha enfermedad (ver todo el documento).

El documento D02 divulga las ventajas de los aptámeros para uso terapéutico; estas moléculas compiten con los anticuerpos debido a que, además de presentar una gran afinidad y especificidad de unión a proteínas, pueden ser sintetizadas químicamente e introducir en ellas modificaciones que mejoren sus propiedades farmacocinéticas (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un método de identificación del gluten hidrolizado en alimentos, o materias primas, dirigidos a pacientes celíacos, mediante un ELISA Competitivo que permite cuantificar las prolaminas total o parcialmente hidrolizadas; así como un kit para llevar a cabo dicho ensayo (ver página 2, línea 10 - página 3, línea 12).

El documento D04 divulga un método de detección y cuantificación de ADN de cereales en alimentos, mediante PCR cuantitativa en tiempo real empleando cebadores específicos para una región conservada de dichos cereales. Dicho método es útil para determinación del gluten en alimentos y control de los dirigidos a pacientes celíacos (ver resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga una molécula de ADN de cadena sencilla, preferentemente que contenga las secuencias definidas como SEQ ID NO: 2-10, como aptámero capaz de reconocer y de unirse específicamente al péptido definido como SEQ ID NO: 1 o al gluten. Se refiere también a un kit y a su uso en un método para detección de gluten en una muestra problema.

1.1. REIVINDICACIONES 1-34

El documento D01 anticipa el péptido de 33 aminoácidos definido en la presente solicitud como SEQ ID NO: 1, proveniente de la alfa-gliadina del gluten, así como su uso en terapia para la enfermedad celíaca. Por otra parte, el documento D02 anticipa el uso de aptámeros en terapia y en clínica por la ventaja que presentan estas moléculas frente a los anticuerpos.

Sin embargo estos documentos no anticipan aptámeros específicos para las proteínas del gluten, ni el uso de aptámeros en terapia para pacientes celíacos. Además, los aptámeros definidos como SEQ ID NO: 2-10 no se han encontrado en el estado de la técnica.

En base a lo expuesto, se concluye que el objeto de las reivindicaciones 1-34 no se encuentra en el estado de la técnica y no podría haber sido deducido del mismo por un experto en la materia a partir de lo divulgado en los documentos D01 y D02. Ninguno de estos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa los aptámeros objeto de la presente invención, ni su uso en un método para detección del gluten.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-34 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.