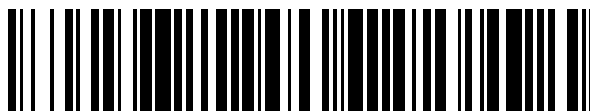


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 595**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03789958 .0**
96 Fecha de presentación: **20.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1563300**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de la celiaquía**

30 Prioridad:
20.11.2002 US 428033 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2012

73 Titular/es:
**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
1705 EL CAMINO REAL
PALO ALTO, CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:
**KHOSLA, Chaitan y
SHAN, Lu**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 383 595 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

PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE LA CELIAQUÍA

- 5 **[0001]** En 1953 se reconoció por primera vez que la ingestión de gluten, una proteína habitual de la dieta presente en el trigo, cebada y centeno produce una enfermedad en individuos sensibles. El gluten es una mezcla compleja de moléculas de prolamina y glutenina ricas en glutamina y prolina, que se cree que es responsable de inducir la enfermedad. La ingestión de dichas proteínas por individuos sensibles produce el aplanamiento del revestimiento epitelial de tipo alfombrado, normalmente frondoso, del intestino delgado que se sabe que es responsable de la digestión terminal eficaz y extensa de péptidos y otros nutrientes. Los síntomas clínicos de la celiacía incluyen fatiga, diarrea crónica, absorción insuficiente de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia, además de un riesgo sustancialmente potenciado de desarrollar osteoporosis y tumores malignos intestinales (linfoma y carcinoma). La enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 200 en poblaciones europeas.
- 10
- 15 **[0002]** Una enfermedad relacionada es la dermatitis herpetiforme, que es una erupción crónica caracterizada por grupos de vesículas extremadamente pruriginosas, pápulas y lesiones de tipo urticaria. Los depósitos de IgA se producen en casi toda la piel de aspecto normal y perilesional. La enteropatía asintomática sensible al gluten se encuentra en 75 a 90 % de los pacientes y en algunos de sus parientes. La aparición normalmente es gradual. El picor y el escozor son intensos, y el rascarse con frecuencia oculta las lesiones primarias con eczematización de la piel cercana, conduciendo a un diagnóstico erróneo de eczema. El estricto cumplimiento de una dieta sin gluten durante periodos prolongados puede controlar la enfermedad en algunos pacientes, eliminando o reduciendo el requisito de terapia con fármacos. Algunas veces se recetan dapsona, sulfapiridina y colchicinas para aliviar el picor.
- 20
- 25 **[0003]** La celiacía se considera en general que es una enfermedad autoinmunitaria y los anticuerpos encontrados en el suero de los pacientes apoyan la teoría de la naturaleza inmunológica de la enfermedad. Los anticuerpos para la transglutaminasa tisular (tTG) y la gliadina aparecen en casi 100 % de los pacientes con celiacía activa, y la presencia de dichos anticuerpos, en particular de la clase IgA, se ha usado en el diagnóstico de la enfermedad.
- 30
- 35 **[0004]** La gran mayoría de los pacientes expresan las moléculas HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)]. Se cree que el daño intestinal se produce por interacciones entre oligopéptidos de gliadina específicos y el antígeno HLA-DQ2 o DQ8, que a su vez induce la proliferación de linfocitos T en las capas subepiteliales. Los linfocitos auxiliares T1 y las citoquinas parece que tienen una función importante en un proceso inflamatorio local que conduce a atrofia vellositaria del intestino delgado.
- [0005]** Actualmente no hay una buena terapia para la enfermedad, excepto el evitar completamente todos los alimentos que contengan gluten. Aunque la retirada del gluten ha transformado el pronóstico para niños y lo ha mejorado sustancialmente para adultos, todavía mueren algunas personas de la enfermedad, principalmente adultos que tenían una enfermedad grave desde el principio. Una causa importante de muerte es la enfermedad del sistema linforreticular (especialmente linfoma intestinal). No se sabe si una dieta sin gluten disminuye este riesgo. La remisión clínica aparente está asociada con frecuencia a la recaída histológica que sólo se detecta por biopsias de evaluación o por un aumento de las valoraciones de EMA.
- 40
- 45 **[0006]** El gluten se usa tan ampliamente, por ejemplo, en sopas, salsas, helados, perritos calientes comerciales, etc., que los pacientes necesitan listas detalladas de productos alimenticios para evitarlos y el consejo experto de un nutricionista familiarizado con la enfermedad celíaca. La ingestión de incluso pequeñas cantidades de gluten puede evitar la remisión o inducir la recaída. También pueden requerirse vitaminas, minerales y hematínicos complementarios, dependiendo de la deficiencia. Algunos pacientes responden mal o no responden a la retirada del gluten, o bien porque el diagnóstico es incorrecto o bien debido a que la enfermedad es resistente al tratamiento. En el último caso, los corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona 10 a 20 mg dos veces al día) pueden inducir respuesta.
- 50
- [0007]** Los procedimientos de diagnóstico actuales para la celiacía son caros y no muy precisos. Estos procedimientos incluyen procedimientos basados en ELISA en los que se detectan anticuerpos dirigidos contra gliadina o dirigidos contra tTG en el suero del paciente, y en los que se observa la proliferación de linfocitos T después de estimulación con gliadina. Sin embargo, con frecuencia estos procedimientos no son suficientemente sensibles para detectar los anticuerpos de diagnóstico en la sangre, o como es el caso de los ensayos de proliferación de linfocitos T, se considera que son demasiado caros para el uso rutinario. Típicamente, aunque un

individuo de positivo en el ensayo de diagnóstico, se debe volver a estimular al individuo con gliadina (típicamente después de mantener una dieta sin gluten durante un periodo de tiempo prolongado) y examinarlo por endoscopia, un procedimiento invasivo y a menudo doloroso.

5 **[0008]** La publicación PCT n° WO 01/25793, publicada el 12 de abril de 2001, describe péptidos derivados de la cartografía de epitopos de la alfa-gliadina y procedimientos para el diagnóstico de la celiaquía usando dichos péptidos. Sin embargo, estos procedimientos no parece que sean significativamente más sensibles que los procedimientos usados actualmente y por lo tanto no superan las limitaciones de los procedimientos de diagnóstico que se usan actualmente.

10

[0009] La publicación PCT n° WO 02/083722 describe receptores de linfocitos T restringidos por HLA-DQ capaces de reconocer péptidos derivados de prolamina, implicados en la enteropatía inmunitaria relacionada con alimentos. Shan y col., *Science*, vol. 207, 27 de septiembre de 2002 (2002-09-27), páginas 2275 – 2279, se refiere a la investigación de una base estructural para la intolerancia al gluten en la celiaquía.

15

[0010] Siguen siendo necesarios mejores procedimientos de diagnóstico para la celiaquía, procedimientos que sean más sensibles que los procedimientos actuales, que no requieran la confirmación por endoscopia, y que no requieran estimular a un individuo con una dieta que contiene gluten para la precisión. La presente invención aborda esta necesidad.

20

RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar la celiaquía en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento detectar la presencia de (i) un oligopéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPF (SEQ ID NO: 12), o un equivalente desamidado del mismo o un equivalente del mismo unido covalentemente a una transaminasa tisular de mamífero, en un tejido, fluido corporal o heces de dicho individuo, usando un anticuerpo que se une específicamente a dicho oligopéptido, equivalente desamidado del mismo o equivalente del mismo unido a una transglutaminasa tisular; o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a dicho oligopéptido, o equivalente del mismo desamidado en un tejido, fluido corporal o heces de dicho individuo, usando dicho oligopéptido, equivalente desamidado del mismo o equivalente del mismo covalentemente unido a una transglutaminasa tisular de mamífero.

30

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

35 **[0012]** Figuras 1A-1B. La membrana de borde en cepillo catalizaba la digestión del péptido de gliadina inmunodominante. Fig. 1A: Trazas en LC-MS de la SEQ ID NO: 1 QLQFPQPQLPY después de la digestión con 27 ng/μl de proteína de membrana de borde en cepillo (BBM) de rata durante el tiempo indicado. Los productos de reacción se separaron por HPLC de fase inversa y se detectaron por espectroscopía de masas (recuentos de iones $m/z = 300 - 2000$ g/mol). Los fragmentos de péptidos indicados se confirmaron por patrones de fragmentación de MS en tándem característicos. El pico de la SEQ ID NO: 2 pyroQLQFPQPQLPY corresponde a una especie pirolglutaminada N-terminal, que se genera durante la purificación por HPLC del material de partida sintético. Fig. 1 B: Abundancia de productos de digestión individuales en función del tiempo. Los fragmentos de péptidos en la Fig. 1A se cuantificaron integrando el área del pico de MS correspondiente ($m/z = 300 - 2000$ g/mol). Las intensidades de MS resultantes se representan gráficamente en función del tiempo de digestión (sólo con BBM, barras coloreadas). El experimento de digestión se repitió en presencia de DPP IV exógena de *Aspergillus fumigatus* (Chemicon International, CA, 0,28 μU de DPP IV/ng de proteína de BBM) y se analizó como antes (barras blancas). La abundancia relativa de diferentes productos intermedios podría calcularse a partir de las trazas de UV₂₈₀ y experimentos de control usando referencias auténticas. El esquema insertado muestra un diagrama interpretativo de las rutas de digestión de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY y sus productos intermedios, las peptidasas de BBM implicadas en cada etapa y los restos de aminoácidos que son liberados. El código de colores para marcar los péptidos es similar al usado en A. La ruta de rotura preferida se indica en negrita. APN = aminopeptidasa N, CPP = carboxipeptidasa P, DPP IV = dipeptidil dipeptidasa IV.

40

45

50

[0013] Figuras 2A-2B. Digestión C-terminal del péptido de gliadina inmunodominante por la membrana de borde en cepillo. Fig. 2A: se digirió la (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY con 27 ng/μl de preparaciones de proteínas de membrana de borde en cepillo (BBM) durante el tiempo indicado y se analizó como en la Fig. 1A. La identidad del material de partida y el producto (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP se corroboraron por fragmentación de MS-MS. La intensidades de masa intrínsecas de los dos péptidos eran idénticas, y el coeficiente de extinción de UV₂₈₀ de la (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP era la mitad del material de partida de acuerdo con la pérdida de una tirosina.

55

Todos los otros productos intermedios eran inferiores ≤ 1 %. El esquema de más abajo muestra la ruta propuesta de digestión por la BBM de la (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY sin procesamiento N-terminal observado (flecha tachada) y la eliminación de la tirosina C-terminal por carboxipeptidasa P (CPP) en negrita. El procesamiento C-terminal adicional por la dipeptidil carboxipeptidasa (DCP) era demasiado lento para permitir el análisis de las 5 posteriores etapas de digestión (flechas de puntos). Fig. 2B: Influencia de la dipeptidil carboxipeptidasa en la digestión C-terminal. La (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY en disolución salina tamponada con fosfato: disolución salina tamponada con Tris = 9: 1 se digirió con BBM sola o con adición de DCP exógena de pulmón de conejo (Cortex Biochemicals, CA) o captopril. Después de la incubación durante la noche, la fracción de la (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP acumulada (comparada con cantidades iniciales de (SEQ ID NO: 3) 10 PQPQLPYPQPQLPY a $t = 0$ min) se analizó como en la Fig. 2A, pero con un gradiente de acetonitrilo de 20-65 % en 6-35 minutos.

[0014] Fig. 3. Aceleración dependiente de la dosis de la digestión mediada por la membrana de borde en cepillo por endoproteasas exógenas. Como se observa en la Fig. 2A-2B, el péptido (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP es estable frente a una posterior digestión. Este péptido se digirió con 27 ng/ μ l de membranas de borde en cepillo, 15 solas, con cantidades crecientes de prolil endopeptidasa exógena (PEP, actividad específica 28 μ U/pg) de *Flavobacterium meningosepticum* (US Biological, MA), o con elastasa adicional (E-1250, Sigma, MO), bromelaína (B-5144, Sigma, MO) o papaína (P-5306, Sigma, MO). Después de una hora, la fracción de la (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP restante (comparada con la cantidad inicial en $t = 0$ min) se analizó y se cuantificó como en la 20 Fig. 1.

[0015] Fig. 4. Productos de digestión de la $\alpha 2$ -gliadina mediada por proteasas gástricas y pancreáticas en condiciones fisiológicas. El análisis se realizó por LC-MS. Los péptidos más largos están marcados por flechas y también en la secuencia de $\alpha 2$ -gliadina (recuadro).

[0016] Fig. 5. Digestión de péptidos in vivo por la membrana de borde en cepillo. Trazas en LC-UV₂₁₆ de la (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF 25 μ M antes de perfusión y después de perfusión (tiempo de permanencia = 20 min). Trazas en LC-UV₂₁₆ de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY 50 μ M antes de perfusión y después de perfusión (tiempo de permanencia = 20 min).

[0017] Fig. 6. Alineamiento de péptidos del gluten y de no gluten representativos homólogos a la (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF.

[0018] Fig. 7. Rotura y destoxicación del péptido de gliadina de 33 aminoácidos con PEP. Incubación in vitro de 35 PEP (540 mU/ml) con el péptido de gliadina de 33 aminoácidos (100 μ M) durante el tiempo indicado. Digestión in vivo del péptido de gliadina de 33 aminoácidos (25 μ M) con PEP (25 mU/ml) y el intestino de rata (tiempo de permanencia = 20 min).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

[0019] La celiaquía se diagnostica detectando un oligopéptido del gluten multivalente resistente a la digestión, anticuerpos que se unen a dicho oligopéptido del gluten en individuos celíacos, como se define en la reivindicación 1. Los oligopéptidos del gluten son muy resistentes a la escisión por las peptidasas gástricas y pancreáticas tales como la pepsina, tripsina, quimiotripsina y similares. Algunos de estos péptidos son multivalentes, en cuanto que 45 comprenden múltiples epítomos de reconocimiento de linfocitos T y/o anticuerpos. El enlace covalente natural de estos epítomos en un polipéptido es un determinante de la hiperantigenicidad en individuos susceptibles, y está relacionado con el desarrollo de la enfermedad y la patología. Al proporcionar la detección en individuos de dicho oligopéptido del gluten, de anticuerpos específicamente reactivos con este, se proporcionan mejores procedimientos de diagnóstico de la celiaquía y/o la dermatitis herpetiforme.

[0020] La presente invención surge en parte del descubrimiento de un oligopéptido de gliadina de 33 aminoácidos que es resistente a la digestión y es un sustrato para la tTGasa. El oligómero de 33 aminoácidos desamidado producido selectivamente por la acción de la tTGasa es un potente activador de linfocitos T. Los análisis experimentales que conducen al descubrimiento de este oligómero de 33 aminoácidos se describen en los 55 siguientes ejemplos. En el ejemplo 1, se ensayó en una variedad de epítomos inmunodominantes (véase Arentz-Hansen y col. (2001), *J. Exp. Med.* 191: 603-612) la resistencia a enzimas proteolíticas encontradas en la digestión. Basándose en parte en los resultados de estos experimentos del ejemplo 1, se sometió una alfa-gliadina a ensayos similares, como se describe en el ejemplo 2. Estos ensayos mostraban que un fragmento relativamente grande de la proteína gliadina era resistente a la digestión por enzimas intestinales. Este fragmento grande que se puede

denominar como el oligómero de 33 aminoácidos de la invención, tiene la secuencia (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF.

OLIGOPÉPTIDOS DEL GLUTEN MULTIVALENTES

5

[0021] El oligopéptido del gluten antigénico de interés para usar en los procedimientos de la invención puede comprender múltiples epítomos de linfocitos T o linfocitos B. Cada epítomo puede ser un epítomo que no se superpone (es decir, estéricamente separado) o que se superpone. En otras palabras, un epítomo que no se superpone se refiere a un epítomo en el que los aminoácidos de un primer epítomo no se integran en la secuencia de un segundo epítomo, y un epítomo que se superpone se refiere a un epítomo en el que los aminoácidos de un primer epítomo se integran en la secuencia de un segundo epítomo. Para los oligopéptidos que comprenden epítomos que no se superponen, cada epítomo diferente está separado de otro epítomo por al menos un enlace peptídico, y puede estar separado por uno o más aminoácidos. Como se usa en el presente documento, el término "epítomo" se refiere a la parte de un antígeno unida por un anticuerpo o receptor de linfocitos T, cuya parte es suficiente para la unión de alta afinidad. En antígenos polipeptídicos, en general un epítomo lineal para el reconocimiento será de al menos aproximadamente 7 aminoácidos de longitud, y puede ser de 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos o más.

[0022] Los anticuerpos también pueden reconocer determinantes conformacionales formados por restos no contiguos en un antígeno, y por lo tanto un epítomo puede requerir que esté presente un fragmento más largo del antígeno para la unión, por ejemplo un dominio de proteína, o sustancialmente toda la secuencia de una proteína. El sitio de unión de anticuerpos típicamente usa múltiples interacciones no covalentes para lograr la unión de alta afinidad. Aunque algunos restos de contacto del antígeno pueden llevarse muy próximos al bolsillo de unión, también pueden ser necesarias otras partes de la molécula de antígeno para mantener una conformación que permita la unión. Con el fin de considerar que una interacción del anticuerpo es "específica", la afinidad será al menos aproximadamente 10^{-7} M, normalmente aproximadamente de 10^{-8} M a 10^{-9} M, y puede ser de hasta 10^{-11} M o mayor para el epítomo de interés. Los expertos en la materia entenderán que el término "especificidad", se refiere a dicha unión de alta afinidad, y no se pretende que signifique que el anticuerpo no se puede también unir a otras moléculas. Se puede encontrar reactividad cruzada con epítomos diferentes debido, por ejemplo a una relación entre la secuencia o estructura del antígeno, o la estructura del propio bolsillo de unión del anticuerpo.

30

[0023] El receptor de linfocitos T reconoce una estructura más compleja que los anticuerpos, y requiere que estén presentes tanto un bolsillo de unión al antígeno de histocompatibilidad como un péptido antigénico. La afinidad de unión de los receptores de linfocitos T es menor que la de los anticuerpos, y normalmente será al menos aproximadamente 10^{-4} M, más normalmente al menos aproximadamente 10^{-5} M.

35

[0024] La afinidad y la estabilidad son medidas diferentes de la interacción de la unión. La definición de afinidad es una expresión termodinámica de la fuerza de la interacción entre un sitio de unión al antígeno individual y un determinante antigénico individual (y por lo tanto de la compatibilidad estereoquímica entre ellos). La afinidad no cambia con la valencia, porque es la medida de la interacción entre un sitio de unión individual y un determinante antigénico individual. A diferencia de la afinidad, la avidéz (que se refiere al $t_{1/2}$ de una interacción) se define como la fuerza de la unión, normalmente de una molécula pequeña con múltiples sitios de unión a una molécula mayor, y en particular, la unión de un antígeno complejo a un anticuerpo. Por lo tanto, es la avidéz la que tiene en cuenta el efecto de las interacciones múltiples, y es el cambio de avidéz lo que puede proporcionar la hiperantigenicidad observada con los oligopéptidos de la SEQ ID NO: 12.

45

[0025] También se sabe en el presente documento que el oligómero de 33 aminoácidos (SEQ ID NO: 12) es un sustrato particularmente bueno para la enzima tGasa, que desamida el oligómero de 33 aminoácidos al menos en las posiciones subrayadas mostradas en la siguiente secuencia: (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF.

50

[0026] El oligopéptido puede comprender restos de glutamina desamidados en una, dos, tres o más posiciones, cuyas posiciones se pueden corresponder o no con las de los oligopéptidos desamidados de forma natural.

[0027] Se ha ensayado la capacidad del oligómero de 33 aminoácidos (SEQ ID NO: 12) y sus equivalentes desamidados para estimular líneas de linfocitos T monoclonales y policlonales de individuos celíacos. Su capacidad estimuladora se comparó con la de una serie de epítomos inmunogénicos contenidos en péptidos más cortos, y el oligómero de 33 aminoácidos y sus equivalentes desamidados mostraron ser mucho más específicos y potentes que los péptidos más cortos.

[0028] Estos resultados proporcionan la base de una serie de procedimientos de diagnóstico mejorados para la celiaquía, así como una variedad de reactivos útiles en estos y otros procedimientos. El oligopéptido del gluten multivalente descrito en la presente invención, en concreto la SEQ ID NO: 12, sus equivalentes desamidados, derivados, análogos y variantes modificadas de forma conservativa, son útiles para estimular los linfocitos T de pacientes celíacos con propósitos de diagnóstico, y por lo tanto la presente invención los proporciona en formas aisladas y muy purificadas. Además, los oligopéptidos del gluten multivalentes descritos en el presente documento, en concreto la SEQ ID NO: 12, sus equivalentes desamidados, derivados, análogos y variantes modificadas de forma conservativa, son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar anticuerpos contra oligopéptidos o para producir anticuerpos que se unen específicamente a dichos oligopéptidos para su detección.

10

FUSIONES DE OLIGOPÉPTIDOS Y TRANSGLUTAMINASA

[0029] También se describe en el presente documento una proteína de fusión que comprende todo o una parte de una tGasa de mamífero, que incluye, pero sin limitar, una tGasa humana, bovina, equina y porcina, que está unida, normalmente de forma covalente, a un oligopéptido del gluten multivalente, en la que el sitio de unión está en un sitio para la desamidación final. Esta proteína de fusión es un estimulador muy potente de linfocitos T de pacientes celíacos en cuanto que la proteína de fusión imita exactamente los complejos formados en los pacientes celíacos y es reconocida por los anticuerpos dirigidos contra la tGasa y por los linfocitos T en esos pacientes. Dichas proteínas de fusión son útiles en los procedimientos de diagnóstico de la invención.

20

[0030] Las transglutaminasas (EC 2.3.2.13) son una familia de enzimas que catalizan la reacción entrecruzada de proteínas por los enlaces isopeptídicos de epsilon-(gamma-glutamil)-lisina. El genoma haploide humana contiene al menos 8 transglutaminasas diferentes que son expresadas de forma diferente en el tiempo-espacio y en rutas específicas de tejidos, y estas enzimas son útiles en la presente invención. Aunque parece que las estructuras primarias generales de estas enzimas son bastante diferentes, todas comparten una secuencia común de aminoácidos en el sitio activo (Y-G-Q-C-W) y una dependencia estricta del calcio para su actividad. Las diferencias en las estructuras primarias de estas transglutaminasas diferentes son responsables de las diversas funciones biológicas que tienen en los procesos fisiológicos.

25

[0031] Las transglutaminasas de interés particular incluyen las enzimas TG1, TG2 y TG3. La transglutaminasa de queratinocitos, TG1, tiene el número de acceso en Genbank D90287 (véase Phillips y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(23): 9333-9337; Yamanishi y col. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175(3): 906-913). Normalmente se expresa en la piel, y está implicada en la formación de barrera de los queratinocitos. La proteína humana tiene una masa molecular de aproximadamente 90 kDa, tiene una extensión de 105 restos más allá del extremo N de la transglutaminasa tisular (TG2). La secuencia de 813 aminoácidos deducida de la proteína TG1 comparte de 49 a 53 % de homología con otras proteínas transglutaminasas de secuencia conocida.

30

[0032] La transglutaminasa tisular 2 (TG2) tiene el número de acceso en Genbank M55153, y codifica una proteína de 687 aminoácidos. Es expresada como un ARNm de 3,6 kb en células endoteliales humanas. La transglutaminasa tisular 3 (TG3) tiene el número de acceso en Genbank L10386, y codifica una proteína de 692 aminoácidos. Es expresada como un ARNm de 2,9 kb. Las secuencias de TG2 y TG3 tienen uso en la producción recombinante del polipéptido codificado.

40

[0033] Los polipéptidos de transglutaminasa se pueden producir por aislamiento de fuentes naturales, procedimientos recombinantes y síntesis química. Además, pueden ser útiles polipéptidos funcionalmente equivalentes, en los que los polipéptidos equivalentes pueden contener eliminaciones, adiciones o sustituciones de restos de aminoácidos que dan como resultado un cambio silencioso, produciendo así un producto génico funcionalmente equivalente expresado de forma diferente en la ruta. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o naturaleza anfipática de los restos implicados. "Funcionalmente equivalente" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína capaz de presentar una actividad sustancialmente similar al polipéptido natural.

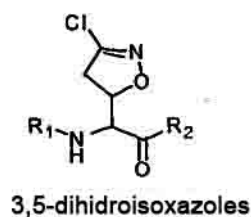
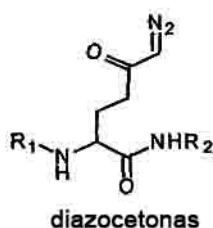
50

[0034] Los polipéptidos se pueden producir por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes y señales de control de la transcripción/traducción adecuadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y de recombinación in vivo/recombinación genética. Alternativamente, se puede preparar por síntesis química ARN capaz de codificar los polipéptidos de interés.

55

[0035] Como se describe en los ejemplos, durante la digestión normal, un núcleo de oligopéptido resistente a peptidasas permanece después de la exposición de los glútenes, p. ej., gliadina, a las enzimas digestivas. Los fragmentos de oligopéptidos de interés incluyen fragmentos de al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, más habitualmente al menos aproximadamente 33 aminoácidos contiguos, y pueden comprender 50 o más aminoácidos, y se puede extender más para comprender secuencias adicionales. Se proporcionan ejemplos de otros oligopéptidos resistentes a peptidasas en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 10. Wieser (1995) *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 9(2): 191-207, discuten otros ejemplos de oligopéptidos de gliadina inmunógenos.

[0036] Los oligopéptidos del gluten multivalentes pueden estar sustituidos con un análogo de glutamina en una o más posiciones, p. ej., para potenciar la formación de un complejo o enlace covalente entre la tTGasa y el análogo peptídico. Los análogos útiles en la preparación del péptido sustituido para este propósito incluyen los siguientes:



[0037] en los que R1 y R2 se seleccionan independientemente de H, grupos alquilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, aralquilo, aralquenilo, halógeno, halogenoalquilo, halogenoalcoxi, heterociclilo y heterocicilalquilo. R1 y R2 también pueden comprender grupos protectores peptídicos. También se proponen como miméticos de glutamina los análogos de aminoácidos 6-diazo-5-oxo-norleucina (Don), azaserina (Aza), 6-tio(tetrametil-imidazoil)-5-oxo-norleucina (Ton), ácido 2-[2-tio(tetrametil-imidazoil)-acil]-2,3-diaminopropiónico (Tad), acivicina (Aci) y 3-cloro-4,5-dihidro-5-amino-isoxazol.

COMPOSICIONES DE POLIPÉPTIDOS Y OLIGOPÉPTIDOS

[0038] Los oligopéptidos y proteínas útiles en los procedimientos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales tales como síntesis, técnicas recombinantes, aislamiento de fuentes naturales, o similares. Por ejemplo, la síntesis de péptidos en fase sólida implica la adición sucesiva de aminoácidos para crear una cadena de péptido lineal (véase, Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154). También se puede llevar a cabo la producción de un péptido o proteína por tecnología de ADN recombinante. Por lo tanto, se pueden preparar oligopéptidos por síntesis in vitro, usando procedimientos convencionales conocidos en la materia. Están disponibles diferentes aparatos de síntesis comerciales, por ejemplo, sintetizadores automáticos de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckman y otros fabricantes. Mediante el uso de sintetizadores, se pueden sustituir aminoácidos naturales por aminoácidos no naturales. La secuencia particular y la forma de preparación estarán determinadas por la conveniencia, economía, pureza requerida, y similares.

[0039] La secuencia de los epítomos proporcionados y los aminoácidos que flanquean los epítomos, se puede alterar de diferentes formas conocidas en la materia para generar cambios dirigidos en la secuencia. Dichas "variantes modificadas de forma conservativa" típicamente serán variantes con la función conservada, que difieren normalmente en la secuencia del correspondiente oligopéptido natural u original, pero todavía mantienen la actividad biológica, es decir, la especificidad de epítomo. Las variantes también pueden incluir fragmentos del oligopéptido que retienen la actividad. Se pueden usar diferentes procedimientos conocidos en la técnica para generar cambios dirigidos, p. ej., presentación de fago en combinación con mutaciones aleatorias y dirigidas, introducción de mutaciones rastreadoras, y similares.

[0040] Una variante puede ser sustancialmente similar a una secuencia natural, es decir, que difiera en al menos un aminoácido y puede diferir en al menos dos pero no más de aproximadamente 10 aminoácidos. Los cambios en la secuencia pueden ser sustituciones, inserciones o eliminaciones. Las mutaciones rastreadoras que introducen sistemáticamente alanina, u otros restos, se pueden usar para determinar aminoácidos clave. Las sustituciones de aminoácidos conservativas normalmente incluyen sustituciones en los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); o (fenilalanina, tirosina).

- [0041]** Las modificaciones de interés que no alteran la secuencia primaria incluyen la derivatización química de proteínas, p. ej., acetilación o carboxilación. También se incluyen en la presente invención oligopéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular y química sintética para así mejorar su resistencia a la degradación proteolítica, a condiciones ácidas tales como las encontradas en el estómago, o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Como ejemplos, la cadena principal de la peptidasa se puede ciclar para potenciar la estabilidad (véase Friedler y col. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 23783-23789). Los análogos de dichas proteínas incluyen aquellos que contienen restos distintos de los L-aminoácidos naturales, p. ej., D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales. Si se desea, se pueden introducir diferentes grupos en el oligopéptido durante la síntesis o durante la expresión, que permiten la unión a otras moléculas o a una superficie. Por lo tanto, se pueden usar cisteínas para hacer tioéteres, histidinas para la unión a un complejo iónico metálico, grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, grupos amino para formar amidas y similares.
- 15 **[0042]** Por lo tanto, la presente invención incluye análogos oligopéptidos de los oligopéptidos descritos por la secuencia de aminoácidos de la presente invención. Dichos análogos contienen al menos una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre el péptido antigénico análogo y el natural. Un L-aminoácido del péptido natural se puede alterar por cualquier otro de los 20 L-aminoácidos encontrados normalmente en proteínas, uno cualquiera de los correspondientes D-aminoácidos, aminoácidos raros tales como 4-hidroxi prolina e hidroxilisina, o aminoácidos no proteínicos, tales como β -alanina y homoserina. También están incluidos en el alcance de la presente invención, los aminoácidos que se han alterado por medios químicos tales como metilación (p. ej., α -metilvalina), desamidación, amidación del aminoácido C-terminal por una alquilamina tal como etilamina, etanolamina y etilendiamina, y acilación o metilación del grupo funcional de la cadena lateral del aminoácido (p. ej., acilación del grupo amino en épsilon de la lisina), desaminación de la arginina a citrulina, isoaspartilación o fosforilación de restos de serina, treonina, tirosina o histidina. Los análogos de oligopéptidos candidatos se pueden cribar por su utilidad en un procedimiento de diagnóstico de la invención mediante un ensayo que mide la unión competitiva al MHC, y un ensayo que mide la proliferación de linfocitos T. Estos análogos que inhiben la unión a los péptidos naturales y que estimulan la proliferación de linfocitos T autorreactivos son reactivos de diagnóstico útiles.
- 30 **[0043]** Los oligopéptidos y análogos de oligopéptidos se pueden sintetizar por técnicas químicas estándar, que incluyen la síntesis mediante un procedimiento automático. En general, los péptidos y análogos de péptidos se preparan por la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida que implica el acoplamiento de cada resto de aminoácidos protegido a un soporte de resina, preferiblemente una resina de 4-metilbencidrilamina, por activación con dicitclohexilcarbodiimida para dar un péptido con una amida C-terminal. Alternativamente, se puede usar una resina de clorometilo (resina de Merrifield) para dar un péptido con un ácido carboxílico libre en el extremo C. Después de unir el último resto, el péptido protegido-resina se trata con fluoruro de hidrógeno para escindir el péptido de la resina, así como desproteger los grupos funcionales de las cadenas laterales. El producto bruto se puede purificar más por filtración en gel, HPLC, cromatografía de reparto o cromatografía de intercambio iónico.
- 40 **[0044]** Los oligopéptidos también se pueden aislar y purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de síntesis recombinantes o de fuentes naturales. Se puede preparar un lisato del huésped de expresión y purificar el lisato usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Para la mayor parte, las composiciones que se usan comprenderán al menos 20 % en peso del producto deseado, más habitualmente al menos aproximadamente 75 % en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 95 % en peso, y para propósitos de diagnóstico, normalmente al menos aproximadamente 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el procedimiento de preparación del producto y su purificación. Normalmente los porcentajes se basarán en la proteína total.
- 50 **[0045]** Los péptidos y proteínas de la invención también se pueden usar para generar otros reactivos útiles de la invención, incluyendo líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales y policlonales derivados de las mismas en forma aislada y purificada. Los péptidos y proteínas de la invención también se pueden usar para generar preparaciones muy purificadas de líneas de linfocitos T, cuya proliferación es estimulada por esos péptidos y proteínas. Dichas líneas celulares y anticuerpos son útiles en procedimientos de diagnóstico de la invención.
- 55 **PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO**

[0046] La presente invención proporciona una variedad de procedimientos de diagnóstico de celiaquía. En una realización, el diagnóstico implica detectar la presencia de un producto de digestión de oligopéptidos del gluten, p. ej., la SEQ ID NO: 12, equivalentes desamidados del mismo; un equivalente del mismo unido a tTGasa, etc., en un

tejido, fluido corporal o heces de un individuo. La etapa de detección se puede lograr usando un reactivo, p. ej., un anticuerpo, que reconoce el antígeno indicado, o por una célula que prolifera en presencia del antígeno indicado y células presentadoras de antígeno adecuadas, en el que dichas células presentadoras de antígeno son compatibles con el tipo MHC de la célula que prolifera, p. ej., células alogénicas, células autólogas, etc.

5

[0047] En otra realización, el diagnóstico implica detectar la presencia de un anticuerpo, uno o más linfocitos T reactivos con el oligómero de 33 aminoácidos o un equivalente desamidado del mismo, o un equivalente del mismo unido a tTGasa, en un tejido, fluido corporal o heces de un individuo. En una realización, se detecta un anticuerpo, por ejemplo, por un ensayo de aglutinación usando un antígeno proporcionado por la presente invención. En otra

10

realización, se detecta un linfocito T por su proliferación en respuesta a la exposición a un oligopéptido del gluten multivalente proporcionado por la presente invención y presentado por células presentadoras de antígeno autólogas o alogénicas adecuadas.

[0048] En un aspecto, los procedimientos de la presente invención y los reactivos descritos en el presente documento son capaces de detectar los oligopéptidos tóxicos de las proteínas del gluten del trigo, cebada, avena y centeno que quedan después de la digestión o digestión parcial de las mismas por un individuo celíaco. El gluten es la fracción proteínica en la masa de cereal, que se puede subdividir en gluteninas y prolaminas, que se pueden subclasificar además como gliadinas, secalinas, hordeínas, aveninas del trigo, centeno, cebada y avena, respectivamente. Para una discusión más detallada de las proteínas del gluten, véase la revisión de Wieser (1996)

15

20

25

Acta Paediatr Suppl. 412: 3-9; incorporada en el presente documento por referencia. Entre las proteínas del gluten de interés se incluyen las proteínas de almacenamiento del trigo, cuyas especies incluyen *Triticum aestivum*; *Triticum aethiopicum*; *Triticum baeoticum*; *Triticum militinae*; *Triticum monococcum*; *Triticum sinskajae*; *Triticum timopheevii*; *Triticum turgidum*; *Triticum urartu*, *Triticum vavilovii*; *Triticum zhukovskyi*; y similares. Se puede encontrar una revisión de los genes que codifican las proteínas de almacenamiento del trigo en Colot (1990) *Genet. Eng.* (N Y) 12: 225-41.

[0049] Tiene un interés particular la gliadina, que es una fracción de proteínas del gluten del trigo soluble en alcohol. Las gliadinas típicamente son ricas en glutamina y prolina, en particular en la parte N-terminal. Por ejemplo, los primeros 100 aminoácidos de las α - y γ -gliadinas contienen ~35 % y ~20 % de restos de glutamina y prolina, respectivamente. Se han caracterizado muchas gliadinas del trigo, y puesto que hay muchas variedades de trigo y otros cereales, se prevé que se obtendrán muchas más secuencias usando procedimientos rutinarios de biología molecular. Los ejemplos de gliadinas secuenciadas incluyen secuencias de alfa-gliadina del trigo, por ejemplo, como las proporcionadas en Genbank, con los números de acceso AJ133612; AJ133611; AJ133610; AJ133609; AJ133608; AJ133607; AJ133606; AJ133605; AJ133604; AJ133603; AJ133602; D84341.1; U51307; U51306; U51304; U51303; U50984; y U08287. Se presenta una secuencia de omega-gliadina del trigo en el número de acceso en Genbank AF280605.

30

35

[0050] Los oligopéptidos de gliadina tóxicos son péptidos obtenidos durante la digestión normal de las gliadinas y proteínas de almacenamiento relacionadas como se ha descrito antes, de cereales alimentarios, por ejemplo trigo, centeno, cebada y similares, en un individuo celíaco. Se cree que dichos oligopéptidos actúan como antígenos para los linfocitos T en individuos celíacos. Para la unión a las proteínas del MHC de clase II, los péptidos inmunogénicos tienen normalmente de aproximadamente 6 a 20 aminoácidos de longitud, más normalmente de aproximadamente 10 a 18 aminoácidos, y como se demuestra en el presente documento, un oligopéptido de la gliadina tóxico particularmente estimulante es el oligómero de 33 aminoácidos descrito anteriormente. Dichos péptidos incluyen

40

45

50

patrones PXP, por ejemplo el patrón PQPQLP (SEQ ID NO: 8). La determinación de si un oligopéptido es inmunogénico para un paciente particular, se determina fácilmente por ensayos de activación de linfocitos T estándar conocidos para los expertos en la materia. Se describen oligopéptidos de gliadina tóxicos ilustrativos en los ejemplos 1 y 2 más adelante. El oligopéptido de gliadina de 33 aminoácidos del ejemplo 2 y su equivalente desamidado formado por la tTGasa son oligopéptidos de gliadina tóxicos preferidos de la invención.

[0051] Las muestras se pueden obtener de tejido del paciente, que puede ser un tejido de la mucosa que incluye, pero sin limitar, tejido de la mucosa oral, nasal, pulmonar e intestinal, un fluido corporal, por ejemplo, sangre, esputo, orina, flema, linfa y lágrimas. Una ventaja de la presente invención, es que los antígenos proporcionados son antígenos tan potentes, tanto para la unión al anticuerpo como para la estimulación de linfocitos T, que los procedimientos de diagnóstico de la invención se pueden usar con muestras (tejido, fluido corporal o heces) en las que un anticuerpo, péptido, o linfocitos T de diagnóstico de celiaquía está presente en muy poca cantidad. Esto permite que los procedimientos de la invención se pongan en práctica en formas que son muchos menos invasivas, mucho menos caras y mucho menos perjudiciales para el individuo celíaco.

55

- [0052]** Se puede hacer el seguimiento en los pacientes de la presencia de linfocitos T reactivos, usando uno o más oligopéptidos multivalentes como se ha descrito antes. La presencia de dichos linfocitos T reactivos indica la presencia de una respuesta inmunitaria en curso. El antígeno usado en los ensayos es un oligopéptido del gluten multivalente como se ha descrito anteriormente; que incluye, sin limitación, la SEQ ID NO: 12; equivalentes 5 desamidados; fusiones del mismo con tTGasa; y derivados. También se pueden usar cócteles que comprenden múltiples oligopéptidos; paneles de péptidos, etc. Se pueden generar oligopéptidos que se superponen, en los que cada péptido está desplazado en el marco de 1 a 5 aminoácidos, generando así un conjunto de epítomos.
- [0053]** El diagnóstico puede determinar el nivel de reactividad, por ejemplo, basándose en el número de linfocitos 10 T reactivos encontrados en una muestra, comparado con un control negativo de un huésped que no ha recibido tratamiento, o normalizado respecto a la curva de datos obtenida de uno o más controles positivos. Además de detectar la presencia cualitativa y cuantitativa de linfocitos T reactivos al antígeno, los linfocitos T pueden clasificarse según la expresión de citoquinas que se sabe que aumentan o suprimen respuestas inflamatorias. Aunque no es necesario para fines de diagnóstico, también puede ser conveniente clasificar la especificidad de epítomos de los 15 linfocitos T reactivos, en particular para usar en la administración terapéutica de péptidos.
- [0054]** Los linfocitos T se pueden aislar de sangre periférica, nódulos linfáticos, incluyendo placas de Peyer y otros nódulos linfáticos relacionados con el intestino, o de muestras de tejidos del paciente como se ha descrito antes. Los ensayos de reactividad se pueden llevar a cabo en linfocitos T primarios, o las células se pueden fusionar para 20 generar hibridomas. Dichos linfocitos T reactivos también se pueden usar para el análisis adicional de la evolución de la enfermedad, mediante el seguimiento de su localización in situ, uso de receptores de linfocitos T, reactividad cruzada de MHC, etc. Los ensayos para el seguimiento del grado de reacción de los linfocitos T son conocidos en la materia e incluyen ensayos de proliferación y ensayos de liberación de citoquinas. También tiene interés un ensayo de manchas por ELISA. 25
- [0055]** Los ensayos de proliferación miden el nivel de proliferación de linfocitos T en respuesta a un antígeno específico, y se usan ampliamente en la materia. En dicho ensayo, se obtienen nódulos linfáticos, sangre o células del bazo del receptor en uno o más momentos después del trasplante. Se prepara una suspensión de aproximadamente 10^4 a 10^7 células, normalmente de aproximadamente 10^5 a 10^6 células y se lava, después se 30 cultiva en presencia de un antígeno de control y antígenos de ensayo, como se ha descrito antes. Las células normalmente se cultivan durante varios días. La proliferación inducida por el antígeno se evalúa mediante el seguimiento de la síntesis del ADN por los cultivos, p. ej., por la incorporación de ^3H -timidina durante las últimas 18 h del cultivo.
- [0056]** Los ensayos de linfocitos T citotóxicos miden el número de linfocitos T citotóxicos que tienen especificidad por el antígeno de ensayo. Se obtienen linfocitos en diferentes momentos después del trasplante. Se ensaya la capacidad de los linfocitos T citotóxicos alorreactivos para matar células diana que llevan moléculas de MHC de clase I del receptor asociadas con péptidos derivados de un antígeno de ensayo. En un ensayo de ejemplo, las 35 células diana que presentan péptidos del antígeno de ensayo, o un antígeno de control, se marcan con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. Después las células diana se añaden a una suspensión de los linfocitos reactivos candidatos. La citotoxicidad se mide mediante la cuantificación de la liberación de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ de las células lisadas. Los controles para la liberación espontánea y total están típicamente incluidos en el ensayo. El porcentaje de liberación de ^{51}Cr específico se puede calcular como sigue: $100 \times (\text{liberación por CTL} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación total} - \text{liberación espontánea})$. 40
- [0057]** El ensayo de inmunoadsorción (ELISA) y ensayos de manchas de ELISA se usan para determinar el perfil de citoquinas de los linfocitos T reactivos, y se pueden usar para el seguimiento de la expresión de citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, γIFN , etc. Los anticuerpos de captura pueden ser cualquier anticuerpo específico para una citoquina de interés, en los que los líquidos sobrenadantes de los ensayos de proliferación de linfocitos T, como se ha descrito antes, se usan convenientemente como una fuente de antígeno. Después de bloqueo y lavado, se 45 añaden los anticuerpos detectores marcados, y se determinan las concentraciones de proteínas presentes en función del marcador que se ha unido. 50
- [0058]** En una realización de la invención, la presencia de linfocitos T reactivos se determina mediante inyección de una dosis del péptido de 33 aminoácidos, o un derivado o fragmento del mismo como se ha descrito antes, por 55 vía subcutánea o submucosa en un paciente, por ejemplo, en la mucosa oral (véase, Lahteenoja y col. (2000) *Am. J. Gastroenterology* 95: 2880). Normalmente se inyecta un control que comprende medio solo o una proteína no relacionada aproximadamente al mismo tiempo. El sitio de inyección se examina después de un periodo de tiempo, por biopsia o para detectar la presencia de un habón.

[0059] Se compara un habón en el sitio de inyección con el del sitio de la inyección del control, normalmente midiendo el tamaño del habón. Las lecturas del ensayo de la piel se pueden evaluar por una variedad de sistemas de gradación objetivos. Un resultado positivo de la presencia de una respuesta inmunitaria mostrará un diámetro mayor en el sitio de inyección del polipéptido comparado con el de control.

5

[0060] Cuando se lleva a cabo una biopsia, se examina en la muestra la presencia de un número creciente de células inmunológicamente activas, p. ej., linfocitos T, linfocitos B, mastocitos, y similares. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos de histoquímica y/o inmunquímica, conocidos en la materia. Se pueden examinar las densidades celulares, incluyendo de los linfocitos T específicos de antígeno, mastocitos, linfocitos B, etc. Se ha descrito que un número mayor de linfocitos T CD8⁺ intraepiteliales se puede correlacionar con reactividad de la gliadina.

10

[0061] Un procedimiento alternativo se basa en la detección de anticuerpos en la circulación en un paciente. Los procedimientos de detección de anticuerpos específicos son bien conocidos en la materia. Se pueden usar anticuerpos específicos para oligopéptidos del gluten multivalentes como se han descrito antes, en inmunoensayos de barrido. Se toma una muestra del paciente. Las muestras usadas en la presente invención incluyen fluidos biológicos tales como sangre, lágrimas, saliva, linfa, líquido de diálisis y similares; fluidos derivados del cultivo órganos o tejidos; y fluidos extraídos de tejidos fisiológicos. También están incluidos en el término derivados y fracciones de dichos fluidos. Tienen un interés particular las muestras de sangre y derivados de las mismas.

20

[0062] La medición de la concentración de anticuerpos específicos en una muestra o fracción de la misma se puede llevar a cabo mediante una variedad de ensayos específicos. En general, el ensayo medirá la reactividad entre una muestra del paciente, normalmente derivada de la sangre, generalmente en forma de plasma o suero. La muestra del paciente se puede usar directamente, o diluida según convenga, normalmente aproximadamente 1: 10 y normalmente no más de aproximadamente 1: 10.000. Se pueden realizar inmunoensayos en cualquier tampón fisiológico, por ejemplo, PBS, disolución salina normal, HBSS, dPBS, etc.

25

[0063] En una realización se usa un ensayo de tipo sándwich convencional. Un ensayo de tipo sándwich se realiza uniendo primero el péptido a una superficie o soporte insoluble. El péptido se puede unir a la superficie mediante cualquier medio conveniente, que depende de la naturaleza de la superficie, sea directamente o mediante anticuerpos específicos. El modo particular de unión no es decisivo siempre que sea compatible con los reactivos y los procedimientos globales de la invención. Se pueden unir a las placas de forma covalente o no covalente, preferiblemente no covalente.

30

[0064] Los soportes insolubles pueden ser de cualquier composición a la que los péptidos se pueden unir, que se pueda separar fácilmente del material soluble, y que por lo demás sea compatible con el procedimiento global de medición de anticuerpos. La superficie de dichos soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Los ejemplos de soportes insolubles adecuados a los que se une el receptor incluyen perlas, p. ej., perlas magnéticas, membranas y placas de microvaloración. Éstas están hechas típicamente de vidrio, plástico (p. ej., poliestireno), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa. Las placas de microvaloración son especialmente convenientes porque se puede llevar a cabo un gran número de ensayos simultáneamente, usando cantidades pequeñas de reactivos y muestras.

40

[0065] Antes de añadir las muestras del paciente o fracciones de las mismas, se bloquean en general los sitios de unión no específicos en el soporte insoluble, es decir, los que no están ocupados por antígeno. Los agentes de bloqueo preferidos incluyen proteínas que no interfieren tales como albúmina de suero bovino, caseína, gelatina, y similares. Alternativamente, se pueden usar varios detergentes en concentraciones que no interfieran, tales como Tween, NP40, TX100, y similares.

45

[0066] Después las muestras, fracciones o partes alícuotas de las mismas se añaden por separado a soportes de ensayo (por ejemplo, pocillos separados de una placa de microvaloración) que contienen el péptido antigénico unido al soporte. Preferiblemente, se ensaya una serie de referencias, que contienen concentraciones conocidas de anticuerpos, en paralelo con las muestras o partes alícuotas de las mismas, para que sirvan como controles.

50

[0067] En general, es suficiente de aproximadamente 0,001 a 1 ml de muestra, diluida o de otra forma, normalmente son suficientes aproximadamente 0,01 ml. Preferiblemente, se añadirá cada muestra y la referencia a múltiples pocillos de modo que se puedan obtener los valores medios para cada uno. El tiempo de incubación debe ser suficiente para que las moléculas de anticuerpo se unan al péptido antigénico insoluble. En general, normalmente es suficiente de aproximadamente 0,1 h a 3 h, normalmente 1 h es suficiente.

55

[0068] Después de la incubación, el soporte insoluble generalmente se lava de los componentes no unidos. En general, se usa un medio de detergente no iónico diluido a un pH adecuado, generalmente 7-8, como medio de lavado. Se pueden usar de 1 a 6 lavados, con suficiente volumen para lavar completamente las proteínas unidas de forma no específica presentes en la muestra.

[0069] Después de lavado, se aplica una disolución que contiene un segundo receptor específico para los anticuerpos del paciente. El receptor puede ser cualquier compuesto que se una a los anticuerpos del paciente con suficiente especificidad de modo que se pueda distinguir de otros componentes presentes. En una realización preferida, los segundos receptores son anticuerpos específicos para anticuerpos del paciente, sueros monoclonales o policlonales, p. ej. anticuerpos de ratón dirigidos contra Ig humana, anticuerpos de ratón dirigidos contra Ig de perro, anticuerpos de conejo dirigidos contra Ig de gato, etc. Dichos anticuerpos de la segunda etapa se pueden marcar para facilitar la cuantificación directa o indirecta de la unión. Los ejemplos de marcadores que permiten la medición directa de la unión del segundo receptor incluyen radiomarcadores, tales como ^3H o ^{125}I , agentes fluorescentes, colorantes, perlas, agentes quimioluminiscentes, partículas coloidales, y similares. Los ejemplos de marcadores que permiten la medición indirecta de la unión incluyen enzimas cuyos sustratos pueden proporcionar un producto coloreado o fluorescente. En una realización preferida, los segundos receptores son anticuerpos marcados con una enzima unida covalentemente capaz de proporcionar una señal de producto detectable después de la adición del sustrato adecuado. Los ejemplos de enzimas adecuadas para usar en conjugados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, malato deshidrogenasa y similares. Cuando no están disponibles en el comercio, dichos conjugados de anticuerpo-enzima, se producen fácilmente por técnicas conocidas para los expertos en la materia. Alternativamente, la segunda etapa puede ser sin marcador, y se usa una tercera etapa marcada. Los ejemplos de parejas de moléculas específicas de segundo receptor/segundo receptor incluyen anticuerpo/anticuerpo y avidina (o estreptavidina)/biotina. Por lo tanto, puesto que la señal resultante está amplificada, esta técnica puede ser ventajosa cuando sólo hay presentes una pequeña cantidad de anticuerpos.

[0070] Después de que la segunda etapa se ha unido, el soporte insoluble en general se lava de nuevo para eliminar las moléculas unidas de forma no específica, y la señal producida por el conjugado unido se detecta por medios convencionales. Cuando se usa un conjugado enzimático, se proporciona un sustrato adecuado para la enzima de manera que se forme un producto detectable. Más específicamente, cuando el conjugado enzimático seleccionado es una peroxidasa, una combinación de sustratos preferida es H_2O_2 y O-fenilendiamina, que produce un producto coloreado en las condiciones de reacción adecuadas. Los sustratos adecuados para los conjugados enzimáticos tales como los descritos antes, son conocidos para los expertos en la materia. Las condiciones de reacción adecuadas así como los medios para detectar los diferentes conjugados útiles o sus productos, también son conocidos para los expertos en la materia. Para el producto del sustrato O-fenilendiamina, por ejemplo, se mide de forma conveniente la absorbancia de luz a 490-495 nm con un espectrofotómetro.

[0071] En general, la cantidad de anticuerpos unidos detectada se comparará con las muestras de control de pacientes normales. La presencia de niveles mayores de los anticuerpos específicos del antígeno es indicativa de enfermedad, normalmente un aumento de al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces o 100 veces, se considerará una reacción positiva.

[0072] En algunos casos, se usará un ensayo competitivo. Además de la muestra del paciente, se añade a la mezcla de reacción un competidor para los anticuerpos. El competidor y los anticuerpos compiten por la unión al péptido antigénico. Normalmente, la molécula competidora se marcará y detectará como se ha descrito previamente, y la cantidad de competidor que se une será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes. La concentración de la molécula competidora será de aproximadamente 10 veces el máximo de la concentración de anticuerpos prevista a aproximadamente la misma concentración con el fin de hacer el intervalo de detección más sensible y lineal.

[0073] Un protocolo alternativo es proporcionar anticuerpos dirigidos contra la Ig del paciente unidos a la superficie insoluble. Después de añadir la muestra y separar por lavado las proteínas unidas de forma no específica, se añade uno o una combinación de los antígenos de ensayo, en la que los antígenos están marcados, de modo que no interfieren con la unión de los anticuerpos. De manera conveniente, se pueden usar proteínas fusionadas, en las que la secuencia peptídica está fusionada a una secuencia enzimática, p. ej., β -galactosidasa.

[0074] Es particularmente conveniente en un marco clínico realizar el inmunoensayo en un aparato autocontrolado. Se conoce una serie de dichos procedimientos en la materia. El aparato en general usará una ruta de flujo continuo de un filtro o membrana adecuados, que tiene al menos 3 regiones, una región de transporte de

fluido, una región de muestra, y una región de medición. Se evita que la región de la muestra se ponga en contacto por transferencia de fluido con las otras partes de la ruta del flujo antes de recibir la muestra. Después de que la región de muestra reciba la muestra, se pone en relación por transferencia de fluido con las otras regiones y la región de transferencia de fluido se pone en contacto con el fluido para permitir que una disolución de reactivo pase a través de la región de la muestra y a la región de medición. La región de medición puede tener unida en la misma el péptido antigénico, con un conjugado de una enzima con un anticuerpo específico de anticuerpos usado como reactivo, añadido en general a la muestra antes de la aplicación. Alternativamente, el péptido antigénico puede estar conjugado con una enzima, con el anticuerpo específico de anticuerpos unido a la región de medición.

10 **[0075]** Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico de celiacía en un individuo que no ha consumido gluten durante un periodo de tiempo prolongado, incluyendo dicho tiempo, pero sin limitar, 1 día, 1 semana, 1 mes y 1 año antes de llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico. La ventaja que confiere este aspecto de la invención es que el diagnóstico actual de un individuo celiaco típicamente implica un diagnóstico preliminar, después del cual el individuo sigue una dieta sin gluten. Si los síntomas del individuo disminuyen después del inicio de la dieta sin gluten, entonces el individuo se estimula con gluten, y se lleva a cabo otro ensayo de diagnóstico, tal como una endoscopia o un ensayo de proliferación de linfocitos T, para confirmar el diagnóstico preliminar. Esta estimulación de nuevo con gluten produce una gran incomodidad al individuo celiaco. Un beneficio importante proporcionado por algunas realizaciones de la invención es que no es necesario llevar a cabo esta nueva estimulación para el diagnóstico de la celiacía, porque usando los procedimientos de la invención se pueden identificar niveles incluso muy bajos de anticuerpos específicos del oligómero de 33 aminoácidos y respondedores de linfocitos T.

[0076] En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico de celiacía detectando la presencia de un anticuerpo específico del oligómero de 33 aminoácidos o un respondedor de linfocitos T en un tejido o fluido corporal distinto de la mucosa intestinal. En este aspecto de la invención, los procedimientos de diagnóstico se llevan a cabo sin recurrir a la endoscopia o biopsia intestinal, evitando de esta forma la incomodidad, dolor y los gastos que conllevan dichos procedimientos en su uso habitual hoy en día.

[0077] Los presentes procedimientos son útiles no sólo para el diagnóstico de individuos celiacos, sino también para determinar la eficacia de los procedimientos profilácticos o terapéuticos para la celiacía, así como la eficacia de la preparación o procedimientos de tratamiento de los alimentos dirigidos a eliminar los glútenes o sustancias similares de las fuentes de alimentos. Por lo tanto, un individuo celiaco tratado de forma eficaz con un fármaco profiláctico o terapéutico u otra terapia para celiacía da ensayos más parecidos a un individuo no celiaco con los procedimientos de la invención. Igualmente, los anticuerpos o respondedores de linfocitos T, p. ej. líneas de linfocitos T, de la invención que detectan los oligopéptidos del gluten tóxicos de la invención son útiles para detectar el gluten y las sustancias de tipo gluten en los alimentos, y por lo tanto se pueden usar para determinar si un alimento tratado para eliminar dichas sustancias se ha tratado de forma eficaz.

[0078] Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se usa para referirse tanto a la prevención de la enfermedad como al tratamiento de afecciones previamente existentes. El tratamiento de la enfermedad en curso para estabilizar o mejorar los síntomas clínicos del paciente tiene un interés particular. Dicho tratamiento se realiza de forma conveniente antes de la pérdida de la función en los tejidos afectados. Pruebas del efecto terapéutico pueden ser cualquier disminución en la gravedad de la enfermedad, en particular midiendo la gravedad de síntomas tales como fatiga, diarrea crónica, absorción insuficiente de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal y anemia. Otros indicios de enfermedad incluyen la presencia de anticuerpos específicos para los oligómeros de 33 aminoácidos de la invención o sus equivalentes desamidados, glútenes, anticuerpos específicos para transglutaminasa tisular o tTGasa unida al oligómero de 33 aminoácidos de la invención o sus equivalentes desamidados, la presencia de linfocitos T y citoquinas proinflamatorias, examen histológico de la estructura de vellosidades del intestino delgado y similares. Los pacientes pueden ser adultos o niños, en los que los niños en particular se benefician del tratamiento profiláctico ya que prevención de la exposición temprana a péptidos del gluten tóxicos puede prevenir el desarrollo inicial de la enfermedad. Los niños adecuados para la profilaxis se pueden identificar por ensayo genético de la predisposición, p. ej., por determinación de HLA; por antecedentes familiares, y preferiblemente, por los procedimientos de diagnóstico de la presente invención.

55 **[0079]** Aunque la presente invención no está ligada a ninguna teoría de acción de las glutenasas, se cree que el suceso primario en la celiacía requiere que oligopéptidos del gluten intactos, tales como los oligómeros de 33 aminoácidos de la invención, accedan a sitios de unión al antígeno dentro de la región de la lámina propia interior a la capa epitelial intestinal de la superficie relativamente impermeable. Habitualmente, los productos finales de oligopéptidos del procesamiento de proteasas pancreáticas son hidrolizados rápida y eficazmente en aminoácidos,

di o tripéptidos por peptidasas gástricas antes de que puedan ser transportados a través de la capa epitelial. Sin embargo, se ha encontrado que los glútenes son particularmente resistentes a las peptidasas, lo cual puede atribuirse al contenido de prolina normalmente alto de estas proteínas, un resto que es inaccesible para la mayoría de las peptidasas gástricas.

5

[0080] La asimilación normal de proteínas de la dieta por el intestino humano puede dividirse en tres fases principales: (i) inicio de la proteólisis en el estómago por pepsina y escisión endo y C-terminales muy eficaz en la cavidad del intestino delgado superior (duodeno) por proteasas y carboxipeptidasas pancreáticas secretadas; (ii) procesamiento adicional de los fragmentos de oligopéptidos resultantes por exo y endopeptidasas ancladas en la membrana de superficie de borde en cepillo del epitelio del intestino delgado superior (yeyuno); y (iii) transporte facilitado de los aminoácidos, di y tripéptidos resultantes a través de las células epiteliales en la lámina propia, desde la que estos nutrientes entran en los capilares para la distribución por todo el cuerpo. Debido a que la mayoría de las proteasas y peptidasas no son capaces de hidrolizar los enlaces amida de restos de prolina, en el presente documento se muestra que la abundancia de restos de prolina en las gliadinas y proteínas relacionadas del trigo, centeno y cebada, pueden constituir un obstáculo digestivo importante para las enzimas implicadas en las fases (i) y (ii) anteriores. Esto conduce a un aumento de la concentración de oligopéptidos derivados del gluten relativamente estable en el intestino.

[0081] La transglutaminasa tisular (tTGasa), una enzima encontrada en la superficie extracelular en muchos órganos incluyendo el intestino, cataliza la formación de enlaces isopeptídicos entre restos de glutamina y de lisina de diferentes polipéptidos, conduciendo a entrecruzamientos de proteína-proteína en la matriz extracelular. La enzima tTGasa es el foco principal de la respuesta del autoanticuerpo en la celiaquía. Las gliadinas, secalinas y hordeínas contienen varias secuencias ricas en restos de Pro-Gln que son sustratos de alta afinidad para la tTGasa; la desamidación catalizada por tTGasa de al menos algunas de estas secuencias, tal como en particular el oligopéptido de 33 aminoácidos de la invención, aumenta espectacularmente su afinidad por HLA-DQ2, el alelo del MHC de clase II presente en > 90 % de pacientes celíacos; y la presentación de estos epítomos desamidados por células presentadoras de antígeno positivas para DQ2 estimula eficazmente la proliferación de linfocitos T específicos para gliadina de biopsias intestinales de la mayoría de los pacientes celíacos. Los efectos tóxicos propuestos del gluten incluyen inmunogenicidad de los oligopéptidos del gluten, que conduce a inflamación, incluyendo por un mecanismo en el que los péptidos de gliadina se unen directamente a receptores de superficie.

[0082] Los diferentes procedimientos y reactivos de la invención se pueden preparar y modificar como se describe a continuación. Aunque en la siguiente descripción se ilustran procedimientos y reactivos específicos, se entiende que se pueden aplicar igualmente una serie de procedimientos alternativos, incluyendo los descritos antes, y son adecuados para la práctica de la invención. Se entenderá también que se puede llevar a cabo una evaluación de los procedimientos de la invención usando procedimientos estándar en la técnica, incluyendo los procedimientos de diagnóstico y evaluación descritos antes.

[0083] La práctica de la presente invención puede usar técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance de los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía tal como en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Galt, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols In Molecular Biology" (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis y col., eds., 1994); y "Current Protocols in immunology" (J.E. Coligan y col., eds., 1991).

[0084] Como se ha indicado antes, los presentes procedimientos son útiles para seguir la evolución y la eficacia de las terapias para tratar a individuos que padecen de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme. Dichas terapias pueden implicar la administración de una dosis eficaz de inhibidor de glutenasa y/o tTGasa, mediante una formulación farmacéutica, incorporando glutenasa en alimentos, administrando organismos vivos que expresan glutenasa, y similares. Puesto que estas terapias pueden no haber sido aprobadas por la FDA u otra agencia reguladora equivalente, los procedimientos de la invención tienen aplicación en ensayos clínicos llevados a cabo para evaluar la seguridad y eficacia de dichas terapias. El diagnóstico de pacientes adecuados puede usar una variedad de criterios conocidos para los expertos en la materia además de los procedimientos descritos en el presente documento. Un aumento cuantitativo de los anticuerpos específicos para gliadina, y/o transglutaminasa tisular, es indicativo de la enfermedad. Los antecedentes familiares y la presencia de los alelos de HLA HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)] son indicativos de una susceptibilidad a la enfermedad.

[0085] Además de usar los procedimientos de diagnóstico de la invención, el efecto terapéutico se puede medir en términos de resultado clínico, o puede basarse en ensayos inmunológicos o bioquímicos. La supresión de la actividad de linfocitos T perjudicial se puede medir mediante enumeración de células Th1 reactivas, cuantificando la liberación de citoquinas en los sitios de lesiones o usando otros ensayos para la presencia de linfocitos T autoinmunitarios conocidos en la técnica. Alternativamente se puede buscar una reducción en los síntomas de una enfermedad.

[0086] Los siguientes ejemplos se exponen de manera que se proporcione a los expertos en la materia una discusión y descripción completas de cómo preparar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención y no pretenden representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura etc.), pero pueden estar presentes algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio ponderado, la temperatura es en grados centígrados y la presión es a o próxima a la atmosférica.

EJEMPLO 1

20 LOS PÉPTIDOS INMUNODOMINANTES DE GLIADINA SON RESISTENTES A PROTEASAS

[0087] Estudios recientes han identificado un número pequeño de péptidos inmunodominantes de la gliadina, que explican la mayor parte de la actividad estimuladora del gluten de la dieta en los linfocitos T intestinales y periféricos encontrados en los pacientes celíacos. Se analizaron las cinéticas proteolíticas de estos péptidos inmunodominantes en la superficie del intestino delgado. Usando vesículas de membrana de borde en cepillo de intestinos de rata adultas, se mostró que estos péptidos ricos en prolina-glutamina son excepcionalmente resistentes al procesamiento enzimático, y que la dipeptidil peptidasa IV y la dipeptidil carboxipeptidasa son las enzimas limitantes de la velocidad en su digestión. Estos resultados apoyan las conclusiones extraídas de los ensayos descritos en el ejemplo 2, de que la digestión incompleta de la gliadina, que produce la formación del oligopéptido de 33 aminoácidos y su equivalente desamidado formado por la acción de la tTGasa, contribuye a los síntomas de la enfermedad de la celiaquía y se pueden usar en procedimientos de diagnóstico mejorados para la celiaquía.

[0088] Para analizar este proceso complejo, se usó el análisis por espectroscopía de masas acoplado a cromatografía de líquidos (LC-MS-MS) para investigar las rutas y cinéticas asociadas con la hidrólisis de los péptidos de gliadina inmunodominantes tratados con preparaciones de BBM de rata. Debido a que el roedor es un modelo animal pequeño excelente para la estructura y función intestinal humana, se eligió la BBM de rata como un sistema modelo adecuado para estos estudios.

[0089] Se prepararon fracciones de BBM de mucosa de intestino delgado de rata como describen Ahnen y col. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12129-35. Usando ensayos estándar, se determinó que las actividades específicas de las peptidasas BB conocidas eran 127 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para la aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2), 60 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5), y 41 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ para la dipeptidil carboxipeptidasa (DCP, EC 3.4.15.1). No eran detectables la actividad de la prolina aminopeptidasa (EC 3.4.11.5) ni la prolil endopeptidasa (PEP, EC 3.4.21.26) ($< 5 \mu\text{U}/\mu\text{g}$). La fosfatasa alcalina y sacarasa se usaron como enzimas de BBM de control con actividades de 66 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$ y 350 $\mu\text{U}/\mu\text{g}$, respectivamente.

[0090] Las fracciones de BBM se purificaron parcialmente de la mucosa de intestino delgado de ratas hembra adultas mantenidas con una dieta a voluntad de comida estándar para roedores basada en trigo. El contenido de proteína total se determinó por un procedimiento modificado de Lowry con BSA como referencia. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó con fosfato de nitrofenilo. La actividad de la sacarasa se midió usando un ensayo de glucosa acoplado. La DPP IV, prolina aminopeptidasa y APN se ensayaron de forma continua a 30 °C en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, que contenía p-nitroanilidas 1 mM ($\epsilon = 8.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Gly-Pro-pNA, Pro-pNA o Leu-pNA, la última en DMSO al 1 % adicional para mejorar la solubilidad. La actividad de la DCP se midió en una reacción de 100 μl como la liberación de ácido hipúrico de Hip-His-Leu. La actividad de la PEP se determinó de forma continua con Z-Gly-Pro-pNA 0,4 mM en PBS: H₂O: dioxano (8: 1,2: 0,8) a 30 °C. Una unidad se define como el consumo de 1 μmol de sustrato por minuto.

[0091] La DPP IV y DCP están ambas reguladas por incremento por un alto contenido de prolina en la dieta. Sin embargo, se encontró que la actividad de la APN usando sustratos estándar era superior a la de la DPP IV incluso

cuando se proporcionaban dietas extremas ricas en prolina. Además, aunque se ha observado una mayor actividad de DCP frente a CPP con el péptido modelo Z-GPLAP en concentraciones de saturación, una diferencia en los valores de K_m podría explicar fácilmente la relación inversa medida en este estudio. Se eligió 100 μM como la concentración inicial de péptido ya que se consideró que la cinética de no saturación (k_{cat}/K_m) era fisiológicamente más relevante que las velocidades máximas de hidrólisis (k_{cat}).

[0092] Se investigó la proteólisis con la preparación de BBM usando el péptido (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY, un producto de digestión quimotriptica de α -9 gliadina (Arentz-Hansen y col. (2000) *J. Exp. Med.* 191, 60312). Se ha mostrado que este péptido estimula la proliferación de linfocitos T aislados de la mayoría de los pacientes celíacos, y por lo tanto se considera que posee un epítipo inmunodominante. Se sometió a digestión por BBM, seguido de análisis por LC-MS-MS. Una mezcla de digestión estándar de 50 μl contenía péptido sintético 100 μM , triptófano 10 μM y Cbz-triptófano como referencias internas, y preparaciones de BBM resuspendidas con un contenido final de proteína de 27 ng/ μl y proteínas exógenas, como se indica, en disolución salina tamponada con fosfato. Después de incubación a 37 °C durante el tiempo indicado, las enzimas se inactivaron mediante calentamiento a 95 °C durante 3 minutos. Las mezclas de reacción se analizaron por LC-MS (SpectraSystem, ThermoFinnigan) usando una columna de fase inversa C18 (Vydac 218TP5215, 2,1x150 mm) con agua: acetonitrilo: ácido fórmico (0,1 %): ácido trifluoroacético (0,025 %) como fase móvil (flujo: 0,2 ml/min) y un gradiente de 10 % de acetonitrilo durante 3 minutos, 10-20 % durante 3 minutos, 20-25 % durante 21 minutos seguido de un lavado al 95 %. Los fragmentos de péptidos en el intervalo de masa de $m/z = 300$ -2000 se detectaron por espectroscopía de masas de ionización por electropulverización usando una trampa de iones LCQ y sus identidades se confirmaron por patrones de fragmentación de MS-MS.

[0093] Mientras que el péptido original (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY desaparecía con un semivida aparente de 35 min, se observó que varios productos intermedios se acumulaban durante periodos prolongados (Fig. 1A). Se encontró que las intensidades de MS ($m/z = 300$ -2000 g/mol) y las absorbancias de UV₂₈₀ de los péptidos originales (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY y (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYQPQLPY dependían de forma lineal de la concentración en el intervalo de 6-100 μM . Los péptidos de referencia (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYQPQLP, (SEQ ID NO: 5) QLQFPQPQLP, (SEQ ID NO: 6) QPQFPQPQLPY y (SEQ ID NO: 7) QPFPQPQLP se generaron individualmente por proteólisis limitada de los péptidos originales con carboxipeptidasa A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C-0261, Sigma) y/o leucina aminopeptidasa 5,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (L-5006, Sigma) durante 160 min a 37 °C y se analizaron por LC-MS como en la Fig. 1.

[0094] De hecho, el posterior procesamiento del péptido se retrasó sustancialmente (Fig. 1B). Las identidades de los productos intermedios principales se confirmaron por MS en tándem, y sugerían un grado de estabilidad anormalmente alto de la secuencia (SEQ ID NO: 8) PQPQLP, un motivo común en péptidos estimuladores de linfocitos T. Basándose en estos datos y las preferencias conocidas de aminoácidos de las peptidasas de BBM, se reconstruyó la rotura digestiva de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY como se muestra en el inserto de la Fig. 1B. La ruta preferida implica la escisión seriada de los restos de glutamina y leucina N-terminales por la aminopeptidasa N (APN), seguido de eliminación de la tirosina C-terminal por la carboxipeptidasa P (CPP) e hidrólisis del dipéptido QP N-terminal que queda por la DPP IV. Como se observa en la Fig. 1B, el producto intermedio (SEQ ID NO: 6) QPFPQPQLPY (formado por el ataque de la APN a los dos primeros restos N-terminales) y sus derivados son cada vez más resistentes a la posterior hidrólisis. Debido a que parecía que el alto contenido de prolina era una causa principal de esta resistencia proteolítica, la digestión se comparó con un péptido de control sin prolina disponible en el comercio (SEQ ID NO: 9) RRLIEDNEYTARG (Sigma, St. Louis, MO). La hidrólisis inicial era mucho más rápida ($t_{1/2} = 10$ min). Y, lo que es más importante, los productos intermedios de la digestión sólo se observaron transitoriamente y se eliminaron completamente en el transcurso de una hora, reflejando una especificidad alta continua de la BBM por los péptidos intermedios.

Debido a que los tres productos intermedios principales (SEQ ID NO: 6) QPFPQPQLPY, (SEQ ID NO: 7) QPFPQPQLP, (SEQ ID NO: 11) FPQPQLP, observados durante la digestión mediada por BBM de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY son sustratos para la DPP IV, el experimento se repitió en presencia de un exceso de actividad de 6 veces de la DPP IV fúngica exógena. Mientras que la disminución relativamente rápida del péptido original y los niveles intermedios de (SEQ ID NO: 5) QLQFPQPQLP en gran medida no cambiaban, la acumulación de sustratos de DPP IV se suprimió completamente, y se observó la digestión completa en el transcurso de 4 horas. (Fig. 1B, barras blancas).

[0095] Para investigar las etapas limitantes de la velocidad en la digestión mediada por BBM de péptidos de gliadina desde el extremo C-terminal, se usó otro péptido inmunodominante conocido derivado de la α -gliadina de trigo, (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYQPQLPY. Aunque no es probable que se formen péptidos con restos de prolina N-

terminales en el intestino delgado (no se observó ninguno durante la digestión por BBM de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY, Fig. 1A), sirven de modelo útil para el análisis del procesamiento C-terminal, ya que el extremo N-terminal de este péptido se puede considerar proteolíticamente inaccesible debido a la actividad mínima de la prolina aminopeptidasa en la BBM. Como se muestra en la Fig. 2, este péptido es incluso más estable que la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY. En particular, la eliminación del resto de tirosina C-terminal por la carboxipeptidasa P (CPP) es el primer suceso en su rotura, y es más de 4 veces más lenta que la actividad de APN en la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY (Fig. 1 B). El sustrato de la DCP, la (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP, surge como un producto intermedio importante tras la catálisis por la carboxipeptidasa P, y es muy resistente a la posterior digestión, supuestamente debido al bajo nivel de la actividad de la DCP endógena asociada de forma natural a la BBM. Para confirmar la función de la DCP como enzima limitante de la velocidad en el procesamiento C-terminal de péptidos de gliadina inmunodominantes, las mezclas de reacción se complementaron con DCP de pulmón de conejo. La DCP exógena reducía significativamente la acumulación de la (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP después de la incubación durante la noche de una forma dependiente de la dosis (Fig. 2C). A la inversa, la cantidad de (SEQ ID NO: 4) PQPQLPYPQPQLP acumulada aumentó más de 2 veces en presencia de captopril 10 μ M, un inhibidor específico de la DCP, en comparación con BBM sin complementar.

[0096] Los resultados anteriores juntos demuestran que (i) los péptidos de gliadina inmunodominantes son excepcionalmente estables frente a la rotura catalizada por peptidasas de la BBM, y (ii) la DPP IV y en especial la DCP son etapas limitantes de la velocidad en este procedimiento de rotura en los extremos N y C terminales de los péptidos, respectivamente. Debido a que las exopeptidasas de BBM están restringidas al procesamiento N o C terminales, se investigó si la generación de extremos de péptidos libres adicionales por las enzimas pancreáticas aceleraría la digestión. De las proteasas pancreáticas ensayadas, sólo la elastasa con una alta concentración (no fisiológica) de 100 ng/ μ l pudo hidrolizar la (SEQ ID NO: 3) PQPQLPYPQPQLPY. No se detectó proteólisis con tripsina ni quimotripsina.

[0097] Los datos anteriores demuestran que los péptidos de gliadina ricos en prolina son extraordinariamente resistentes a la digestión por endo y exopeptidasas del intestino delgado, y por lo tanto es probable que se acumulen en altas concentraciones en la cavidad intestinal después de una comida rica en gluten. La implicación patológica de la resistencia digestiva es reforzada por la estrecha correlación observada del contenido de prolina y la toxicidad celiaca observada en diferentes cereales comunes (Schuppan (2000) *Gastroenterology* 119, 234-42).

EJEMPLO 2

PÉPTIDO INMUNODOMINANTE DE LA GLIADINA DE TRIGO

[0098] Se sabe desde hace tiempo que los principales componentes tóxicos del gluten del trigo son una familia de proteínas ricas en Pro-Gln estrechamente relacionadas llamada gliadinas. Publicaciones recientes han sugerido que parece que los péptidos de un segmento corto de α -gliadina explican la mayor parte del reconocimiento específico del gluten por linfocitos T CD4 + de pacientes celíacos. Estos péptidos son sustratos de la transglutaminasa tisular (tTGasa), el auto-antígeno principal en la celiaquía, y los productos de esta reacción enzimática se unen a la molécula HLA DQ2 de clase II. Este ejemplo que usa una combinación de estudios en animales y seres humanos in vitro e in vivo, demuestra que esta región "inmunodominante" de α -gliadina es parte de un producto proteolítico anormalmente largo generado por el proceso digestivo, que: (a) es excepcionalmente resistente a la posterior rotura por las proteasas de borde en cepillo gástricas, pancreáticas e intestinales; (b) es el sustrato de mayor especificidad de transglutaminasa tisular humana (tTGasa) descubierto hasta la fecha; (c) contiene al menos seis copias que se superponen de epítomos que se sabe que son reconocidas por linfocitos T obtenidos de pacientes; (d) estimula clones de linfocitos T representativos que reconocen estos epítomos con eficacia submicromolar; y (e) tiene homólogos en las proteínas de todos los cereales tóxicos, pero no tiene homólogos en proteínas de cereales no tóxicos. En conjunto, estos descubrimientos demuestran que la aparición de síntomas tras la exposición al gluten se puede rastrear hasta un pequeño segmento de α -gliadina. Finalmente, se muestra que este péptido largo "super-antigénico" se puede detoxificar in vitro e in vivo por tratamiento con la prolil endopeptidasa bacteriana, proporcionando una estrategia para la terapia con peptidasas para la celiaquía.

[0099] La identificación de péptidos estables de proteasa gástrica, proteasa pancreática y peptidasa de la membrana de borde en cepillo catalizaba la digestión de α 2-gliadina recombinante: la α 2-gliadina, una α -gliadina representativa (Arentz-Hansen y col. (2000) *Gut* 46: 46), se expresó en forma recombinante y se purificó a partir de *E. coli*. El gen de la α 2-gliadina se clonó en el plásmido pET28a (Novagen) y se transformó en el huésped de expresión BL21 (DE3) (Novagen). Las células transformadas se cultivaron en cultivos de 1 litro de medio LB que contenía kanamicina 50 μ g/ml a 37 °C hasta que se alcanzó la DO600 0,6-1. La expresión de la proteína α 2-gliadina

se indujo por la adición de isopropil β-D-tiogalactósido 0,4 mM (Sigma) y los cultivos se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 20 horas. Las células que expresaban la α2-gliadina recombinante se centrifugaron a 3600 rpm durante 30 minutos. El sedimento se volvió a suspender en 15 ml de tampón de alteración (fosfato de sodio 200 mM; NaCl 200 mM; DTT 2,5 mM; benzamidina 1,5 mM; EDTA 2,5 mM; pepstatina 2 mg/l; leupeptina 2 mg/l; glicerina al 30 % v/v) y se lisó por tratamiento con ultrasonidos (1 minuto; control de salida ajustado a 6). Después de la centrifugación a 45000 g durante 45 min, el líquido sobrenadante se desechó y el sedimento que contenía la proteína gliadina se volvió a suspender en 50 ml de urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0). La suspensión se centrifugó de nuevo a 45000 g durante 45 min y se recogió el líquido sobrenadante para la purificación.

- 10 **[0100]** El líquido sobrenadante que contenía α2-gliadina se incubó con 1 ml de resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA; Qiagen) durante la noche y después se cargó en lotes en una columna con 2 ml de Ni-NTA. La columna se lavó con urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 8,0) y la α2-gliadina se eluyó con imidazol 200 mM, urea 7 M en Tris 50 mM (pH = 4,5). Las fracciones que contenían α2-gliadina se mezclaron a una concentración final de disolución en etanol al 70 % y se añadieron dos volúmenes de NaCl 1,5 M para precipitar la proteína. La disolución se incubó a 4 °C durante la noche y el precipitado final se recogió por centrifugación a 45000 g durante 30 min, se lavó con agua y se volvió a centrifugar para eliminar la urea. La etapa de purificación final de la α-2 gliadina se desarrolló con HPLC en fase inversa. Las fracciones de proteína purificada en Ni-NTA se mezclaron en tampón de urea 7 M y se inyectaron en una columna de fase inversa de poliestireno Vydac (Hesperia, CA) (d.i. 4,6 mm x 25 cm) con el disolvente de partida (30 % de disolvente B: acetonitrilo de calidad para HPLC/isopropanol 1: 1 : TFA al 0,1 %). El disolvente A era una disolución acuosa con TFA al 0,1 %. El gradiente de separación se extendió a 30-100 % de disolvente B en 120 min con un caudal de 0,8 ml/min.

Tabla 2. Cantidad de péptidos digeridos después de 15 horas

	oligómero de 33 aminoácidos	Control A	Control B
H1P0	< 20 %	> 90 %	> 90 %
H2P0	< 20 %	> 61 %	> 85 %
H3P0	< 20 %	> 87 %	> 95 %
H4P0	< 20 %	> 96 %	> 95 %
H5P0	< 20 %	> 96 %	> 95 %

- 25 **[0101]** La pureza de la gliadina recombinante era > 95 %, lo que permitió la fácil identificación y asignación de productos proteolíticos por LC-MS/MS/UV. Aunque muchos estudios previos utilizaban gliadinas tratadas con pepsina/tripsina, se encontró que, entre las proteasas gástricas y pancreáticas, la quimotripsina tenía una función importante en la rotura de la α2-gliadina, produciendo muchos péptidos pequeños a partir de la mitad C-terminal de la proteína y algunos péptidos más largos (> 8 restos) a partir de la mitad N-terminal, siendo el más notable un fragmento relativamente grande, el oligómero de 33 aminoácidos (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (restos 57-89). Este péptido tenía un interés particular por dos motivos: (a) mientras que la mayoría de los otros fragmentos proteolíticos relativamente estables se escindían en fragmentos más pequeños cuando se prolongaban los tiempos de reacción, el péptido de 33 aminoácidos permanecía intacto a pesar de la exposición prolongada a proteasas; y (b) en este péptido están presentes tres epítomos distintos de linfocitos T específicos del paciente previamente identificados, en concreto PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ (3 copias), y PYPQPQLPY (2 copias).

- 40 **[0102]** Para establecer la importancia fisiológica de este péptido, después se examinó la digestión enzimática gástrica/pancreática compuesta de la α2-gliadina. Como se esperaba, la digestión enzimática con pepsina (relación 1: 100 en peso/peso), tripsina (1: 100), quimotripsina (1: 100), elastasa (1: 500) y carboxipeptidasa (1: 100) era bastante eficaz, dejando sólo algunos péptidos de más de 9 restos (el tamaño mínimo de un péptido para mostrar antigenicidad mediada por MHC de clase II) (Figura 4). Además del oligómero de 33 aminoácidos mencionado antes, también se identificó el péptido WQIQEQSR y se usó como control en muchos de los siguientes estudios. La estabilidad del péptido de 33 aminoácidos también se puede observar cuando se comparan los resultados de un experimento similar usando mioglobina (otra proteína de la dieta común). En condiciones proteolíticas similares, la mioglobina se rompe rápidamente en productos mucho más pequeños. No se observa que se acumule un producto intermedio largo.

- 50 **[0103]** Se sabe que las enzimas de la membrana del borde en cepillo (BBM) del intestino delgado son vitales para la rotura de cualquier péptido que quede de la digestión gástrica/pancreática en aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos para la absorción nutricional. Por lo tanto, un análisis exhaustivo del metabolismo de la gliadina también

requería investigaciones sobre el procesamiento por la BBM de péptidos de gliadina de longitud razonable derivados del tratamiento con proteasas gástricas y pancreáticas. Las fracciones de BBM se prepararon a partir de mucosa del intestino delgado de rata. Se verificó que las actividades específicas de las peptidasas de BBM conocidas estaban dentro del intervalo previamente descrito. Mientras que la semivida de la desaparición de WQIPEQSR era ~60 min en presencia de proteína de BBM 12 ng/μl, la semivida de la digestión de la (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF era > 20 h. Por lo tanto, el último péptido sigue intacto durante todo el proceso digestivo en el estómago y el intestino delgado superior, y está preparado para actuar como un potencial antígeno para la proliferación de linfocitos T y toxicidad intestinal en individuos genéticamente susceptibles.

10 **[0104]** *Verificación de la resistencia proteolítica del péptido de gliadina de 33 aminoácidos con preparaciones de membrana de borde en cepillo de biopsias intestinales humanas:* para validar las conclusiones anteriores obtenidas de estudios con preparaciones de BBM de rata, en el contexto de la digestión intestinal humana se prepararon preparaciones de BBM a partir de un panel de voluntarios humanos adultos, uno de los cuales era un paciente con celiaquía en remisión, mientras que se encontró que el resto tenía histología intestinal normal. Se incubaron las
15 (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF, (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY (una secuencia interna del oligómero de 33 aminoácidos usada como control), WQIPEQSR y otros péptidos de control (100 μM) con BBM preparada a partir de cada biopsia humana (actividad final de la aminopeptidasa N 13 μU/μl) a 37 °C durante periodos de tiempo variables. Mientras que QLQFPQPQLPY, WQIPEQSR y otros péptidos de control se proteolizaron completamente en 1-5 h, el péptido largo siguió en gran parte estable durante 19 horas. Estos
20 resultados confirman la equivalencia entre la BBM de rata y humana para los propósitos de este estudio.

[0105] *Verificación de la resistencia proteolítica del péptido de gliadina 33 aminoácidos en animales intactos:* la resistencia proteolítica del péptido de gliadina de 33 aminoácidos, observada in vitro usando BBM de ratas y seres humanos, se confirmó in vivo usando un protocolo de perfusión en ratas adultas intactas (Smithson y Gray (1977) *J. Clin. Invest.* 60: 665). Se perfundieron disoluciones de péptido purificado a través de un segmento de 15-20 cm de yeyuno en una rata sedada con un tiempo de permanencia de 20 min, y los productos se recogieron y se sometieron a análisis de LC-MS. Mientras que > 90 % de la (SEQ ID NO: 1) QLQFPQPQLPY se proteolizó en el experimento de perfusión, la mayor parte del péptido de gliadina de 33 aminoácidos permaneció intacta. Estos resultados demuestran que el péptido de 33 aminoácidos es muy estable ya que es transportado por todo el intestino delgado
30 superior del mamífero.

[0106] El péptido de gliadina de 33 aminoácidos es un excelente sustrato para la tTGasa, y el producto resultante es un activador muy potente de linfocitos T obtenidos de pacientes. Una serie de estudios recientes han demostrado que la desamidación regioespecífica de péptidos de gliadina inmunogénicos por la tTGasa aumenta su afinidad por HLA-DQ2, así como la potencia con la que activan linfocitos T específicos de gluten obtenidos de pacientes. Se ha
35 mostrado que la especificidad de la tTGasa por determinados péptidos antigénicos cortos derivados de gliadina es mayor que su especificidad hacia su sitio diana fisiológico en la fibronectina, por ejemplo, la especificidad de la tTGasa para el péptido derivado de α-gliadina PQPQLPYQPQLPY es 5 veces mayor que la especificidad por su secuencia de péptido diana en el fibrinógeno, su sustrato natural. Por lo tanto, se midieron la cinética y la
40 regioespecificidad de la desamidación del péptido de α-gliadina de 33 aminoácidos identificado como antes. La k_{cat}/K_M era mayor que la descrita para cualquier péptido estudiado hasta ahora: $k_{cat}/K_M = 440 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para la (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF en comparación con $k_{cat}/K_M = 82 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para PQPQLPY y $k_{cat}/K_M = 350 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para PQPQLPYQPQLPY.

45 **[0107]** Además, el análisis por LC-MS-MS puso de manifiesto que la (SEQ ID NO: 12) LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF era desamidada selectivamente por la tTGasa en los restos subrayados. Puesto que la actividad de la tTGasa está asociada con la membrana de borde en cepillo de enterocitos intestinales, es probable que la ingestión alimentaria incluso de pequeñas cantidades de gluten de trigo conduzca a la acumulación de cantidades suficientes de este péptido de gliadina de 33 aminoácidos en el lumen intestinal de
50 manera que sea reconocido y procesado por la tTGasa.

[0108] *Características estructurales del péptido de gliadina de 33 aminoácidos y sus homólogos naturales:* las búsquedas de alineamientos de secuencias usando BLASTP en todas las bases de datos de proteínas no redundantes pusieron de manifiesto varios homólogos (valor de $E < 0,001$) del péptido de gliadina de 33 aminoácidos. Es interesante que los homólogos derivados de cereales sólo se encontraron en gliadinas (de trigo),
55 hordeínas (de cebada) y secalinas (de centeno), las cuales han demostrado ser todas tóxicas para pacientes celíacos. Véase la figura 6. Las proteínas de cereales no tóxicas, tales como aveninas (en avena), arroz y maíz, no contienen secuencias homólogas a la gliadina de 33 aminoácidos. A diferencia de esto, una búsqueda en BLASTP con la secuencia de la α2-gliadina entera identificó homólogos de proteínas de cereales tanto de proteínas tóxicas

como no tóxicas. Basándose en la información disponible en relación con las especificidades de sustrato de proteasas y peptidasas gástricas, pancreáticas y de BBM, se prevé que, aunque la mayoría de los homólogos del gluten del péptido de gliadina de 33 aminoácidos contienen múltiples sitios proteolíticos y, por lo tanto, no es probable que sean completamente estables frente a la digestión, se espera que varias secuencias del trigo, centeno y cebada sean comparablemente resistentes a la proteólisis gástrica e intestinal. Los homólogos de péptidos estables del péptido de la α 2-gliadina de 33 aminoácidos son QPQPFPQLPYPQTQPFPPQYPQPQPYPQPQ (de α 1- y α 6-gliadinas); QQQFPQPQPQPYPQPQPYPQPFPQPF (de hordeína B1); QPFPQPQTFPQPQLPFPQPQPFPQPQ (de γ -gliadina); QPFPQPQPTPIQPQPFPQRPQPFPQPQ (de ω -secalina). Estos péptidos estables están todos localizados en la región N-terminal de las proteínas correspondientes.

10 La presencia de restos de prolina después de restos escindibles de otro modo en estos péptidos contribuiría a su estabilidad proteolítica.

[0109] La única secuencia primaria del péptido de gliadina de 33 aminoácidos también tenía homólogos entre algunas proteínas que no son del gluten. Entre los homólogos más fuertes estaban las secuencias internas de la pertactina (una proteína muy inmunogénica de *Bordella pertussis*) y una inositol-polifosfato 5-fosfatasa de mamífero de función desconocida. En ambos casos, la información disponible sugería que la homología podía tener importancia biológica. Por ejemplo, la región de la pertactina que es homóloga al péptido de gliadina de 33 aminoácidos se sabe que es parte del segmento inmunodominante de la proteína. En el caso de la fosfatasa homóloga, la correspondiente región peptídica de la fosfatasa se sabe que es responsable del tráfico vesicular de la fosfatasa al aparato de Golgi citoplasmático. En analogía con la imagen actual de cómo los péptidos de gliadina son presentados a HLA-DQ2 por una ruta mediada por la tTGasa, es probable que estos segmentos ricos en Pro-Gln tanto de la pertactina como de la fosfatasa sean buenos sustratos de la tTGasa. Para ensayar esta hipótesis, se sintetizaron los correspondientes péptidos y se midió la selectividad de la tTGasa por estos péptidos. Como se había predicho, se encontró que ambos péptidos eran buenos sustratos de la tTGasa. La enzima tTGasa tiene una función central en la endocitosis mediada por receptor de varias proteínas biológicamente importantes. Las actividades biológicas tanto de la pertactina como de la fosfatasa pueden depender del tráfico mediado por la tTGasa.

15
20
25

[0110] Estudios estructurales secundarios usando espectroscopía de dicroísmo circular en el péptido de gliadina de 33 aminoácidos así como sus homólogos de la pertactina y la inositol-polifosfato 5-fosfatasa demuestran que estos péptidos tienen un fuerte carácter helicoidal de poliprolina de tipo II. Además de reforzar la resistencia proteolítica de estos péptidos, es probable que la conformación helicoidal de poliprolina de tipo II también potencie su afinidad por las proteínas MHC de clase II.

30

[0111] Aunque las proteínas del gluten de cereales tales como el trigo, cebada y centeno son componentes centrales en una dieta nutricional, pueden ser extremadamente tóxicos para pacientes que padecen celiaquía. Para elucidar la base estructural de la toxicidad del gluten en la celiaquía, se llevó a cabo un análisis proteolítico exhaustivo en una gliadina recombinante representativa en condiciones fisiológicamente relevantes. Se descubrió un producto peptídico anormalmente largo y proteolíticamente estable, cuya importancia fisiológica se confirmó mediante estudios que implicaban proteínas de la membrana de borde en cepillo de intestinos de rata y seres humanos, así como ensayos de perfusión intestinal en ratas vivas. Estos datos juntos demuestran que este péptido y sus homólogos encontrados en otras proteínas del trigo, centeno y cebada son la "causa primordial" de la respuesta inflamatoria inicial al trigo de la dieta en pacientes con celiaquía en remisión.

35
40

LISTA DE SECUENCIAS

45

[0112]

< 110 > KHOSLA, CHAITAN SHAN, LU
 < 120 > Procedimiento de diagnóstico de la celiaquía
 50 < 130 > STAN-258WO5
 < 150 > 60/428.033
 < 151 > 2002-11-20
 < 160 > 26
 < 170 > FastSEQ for Windows Version 4.0
 55 < 210 > 1
 < 211 > 12
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 1

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

- < 210 > 2
- 5 < 211 > 12
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 220 >
- < 221 > PYRROLIDONE CAR
- 10 < 222 > (1)...(12)
- < 400 > 2

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

- 15 < 210 > 3
- < 211 > 14
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 3
- 20

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10

- < 210 > 4
- < 211 > 13
- 25 < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 4

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5 10

- 30 < 210 > 5
- < 211 > 11
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- 35 < 400 > 5

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5 10

- < 210 > 6
- 40 < 211 > 11
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 6

ES 2 383 595 T3

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

- < 210 > 7
- < 211 > 9
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 7

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5

- 10 < 210 > 8
- < 211 > 6
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- 15 < 400 > 8

Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5

- 20 < 210 > 9
- < 211 > 13
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 9

Arg Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gly
1 5 10

- 25 < 210 > 10
- < 211 > 9
- < 212 > PRT
- 30 < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 10

Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5

- 35 < 210 > 11
- < 211 > 7
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 11

40

Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5

- < 210 > 12

ES 2 383 595 T3

< 211 > 33
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 12

5

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 > 13
 < 211 > 34
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 13

10

Gln Pro Gln Pro Phe Pro Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Thr Gln Pro
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Tyr Pro Gln
 20 25 30
 Pro Gln

15

< 210 > 14
 < 211 > 35
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 14

Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Ile Pro Gln Gln Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Tyr Pro Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln
 20 25 30
 Gln Pro Phe
 35

< 210 > 15
 < 211 > 30
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 15

25

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gln Gln Pro Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln
 20 25 30

30

< 211 > 59
 < 212 > PRT
 < 213 > Triticum aestivum
 < 400 > 16

35

ES 2 383 595 T3

Pro Gln Gln Pro Gln Leu Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe
 1 5 10 15
 Pro Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Ser Gln Gln Pro
 20 25 30
 Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln Pro Gln Gln
 35 40 45
 Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln Gln Pro
 50 55

- < 210 > 17
- < 211 > 30
- 5 < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 17

Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Thr Pro Ile Gln Pro Gln Gln
 1 5 10 15
 Pro Phe Pro Gln Arg Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln
 20 25 30

- 10 < 210 > 18
- < 211 > 9
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- 15 < 400 > 18

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
 1 5

- 20 < 210 > 19
- < 211 > 9
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 19

Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
 1 5

- 25 < 210 > 20
- < 211 > 9
- < 212 > PRT
- 30 < 213 > Triticum aestivum
- < 400 > 20

Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5

- 35 < 210 > 21
- < 211 > 9
- < 212 > PRT
- < 213 > Triticum aestivum

< 400 > 21

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln
1 5

5 < 210 > 22
< 211 > 9
< 212 > PRT
< 213 > Triticum aestivum
< 400 > 22
10

Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5

< 210 > 23
< 211 > 9
15 < 212 > PRT
< 213 > Triticum aestivum
< 400 > 23

Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln
1 5

20
< 210 > 24
< 211 > 11
< 212 > PRT
< 213 > Triticum aestivum
25 < 400 > 24

Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
1 5 10

< 210 > 25
30 < 211 > 9
< 212 > PRT
< 213 > Triticum aestivum
< 400 > 25

Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5

35
< 210 > 26
< 211 > 27
< 212 > PRT
40 < 213 > Triticum aestivum
< 400 > 26

ES 2 383 595 T3

Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu
1 5 10 15
Pro Tyr Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico de celiaquía en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento detectar la presencia de (i) un oligopéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos
5 LQLQPFQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 12), o un equivalente desamidado del mismo o un equivalente del mismo unido covalentemente a una transglutaminasa tisular de mamífero en un tejido, fluido corporal o heces de dicho individuo, usando un anticuerpo que se une específicamente a dicho oligopéptido, equivalente desamidado del mismo o equivalente del mismo unido covalentemente a una transglutaminasa tisular de mamífero;
10 o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a dicho oligopéptido o equivalente desamidado del mismo, en un tejido, fluido corporal o heces de dicho individuo, usando dicho oligopéptido, equivalente desamidado del mismo o equivalente del mismo unido covalentemente a una transglutaminasa tisular de mamífero.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho tejido es un tejido de mucosa seleccionado del grupo que consiste en tejido de la mucosa oral, nasal, pulmonar e intestinal.
15
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en sangre, esputo, orina, flema, linfa y lágrimas.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho individuo no ha consumido gluten durante un
20 periodo de tiempo prolongado.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho individuo no se ha sometido a una endoscopia.

FIG. 1A

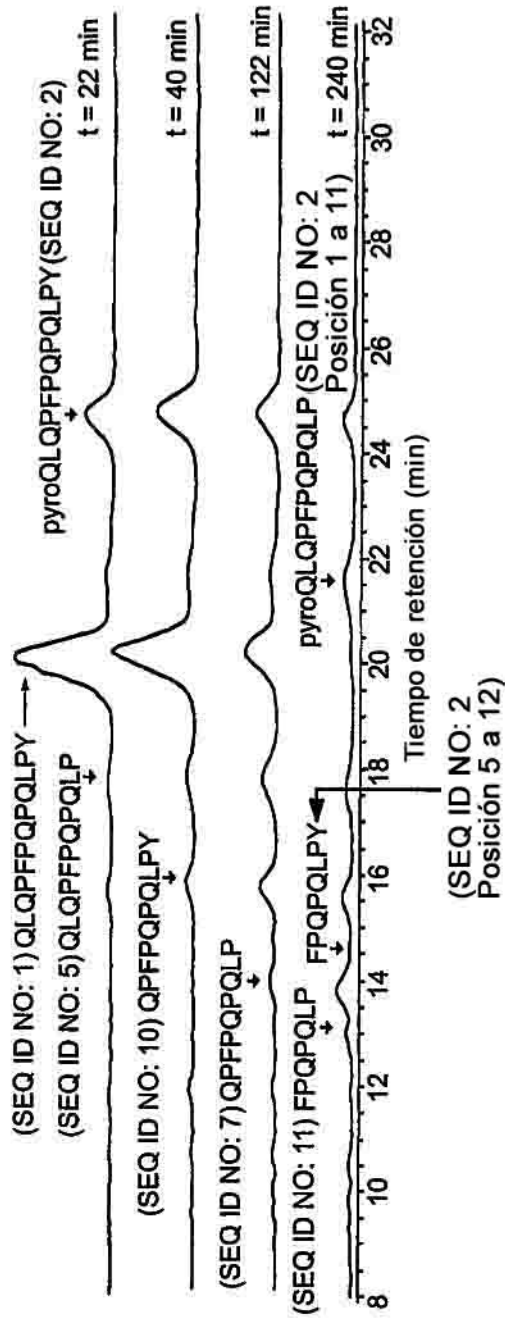
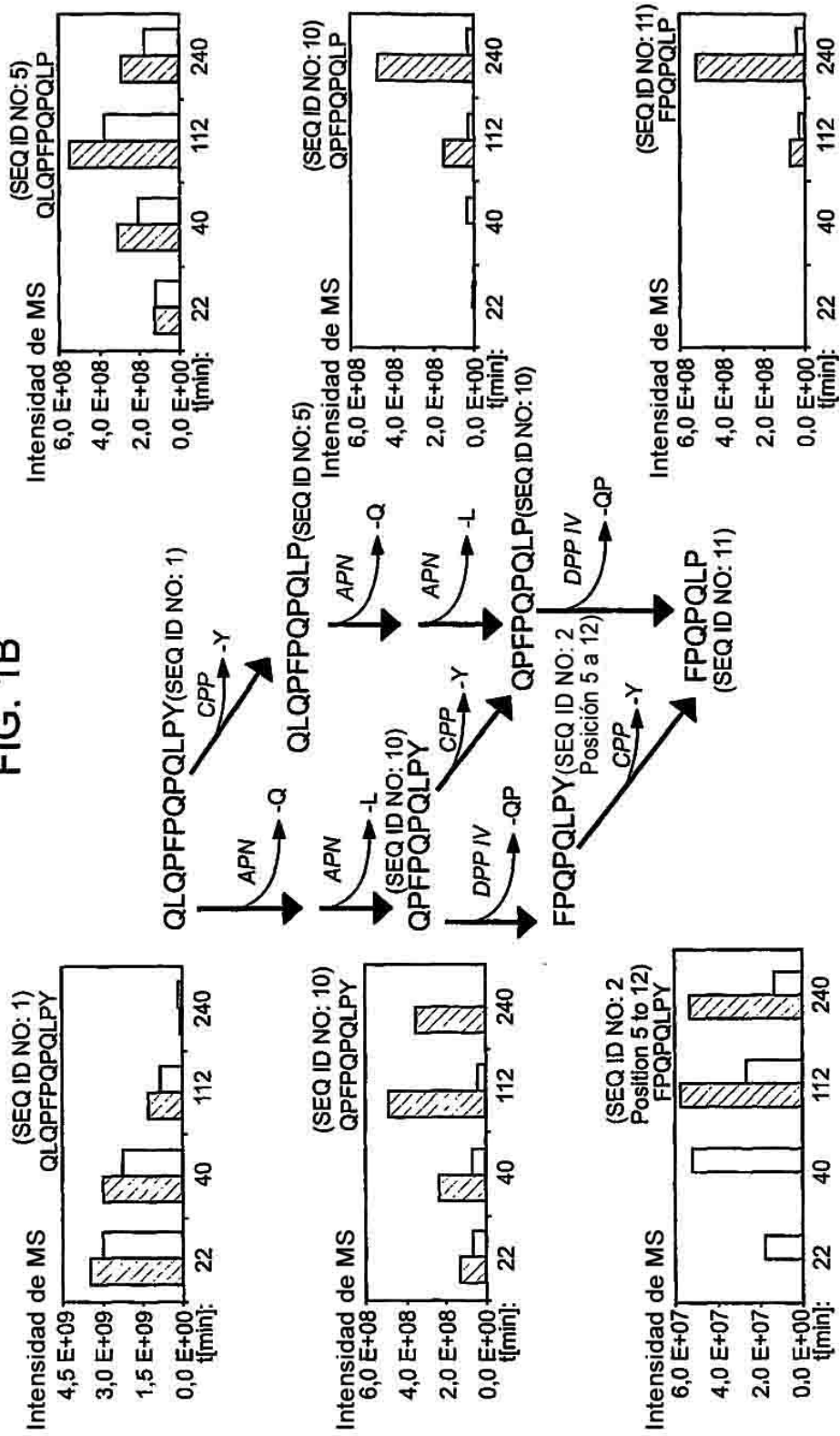


FIG. 1B



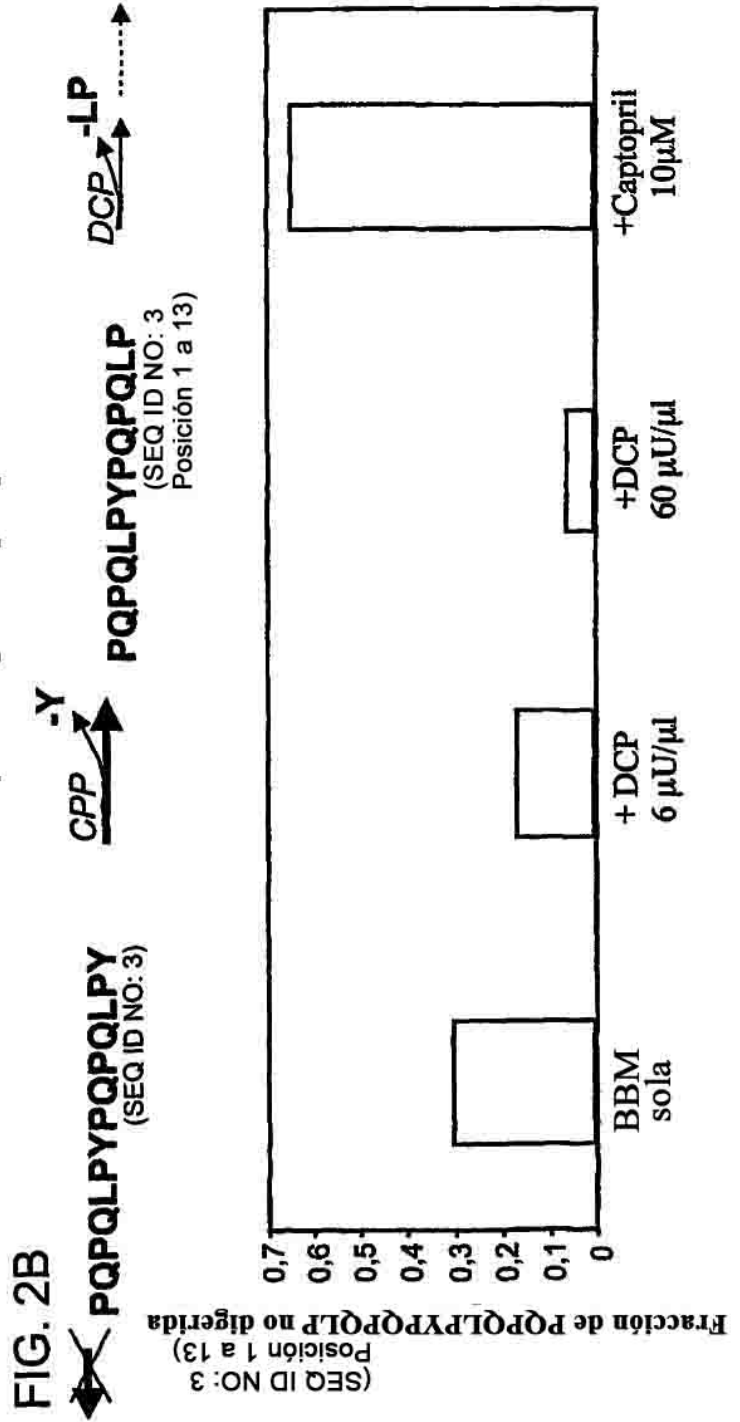
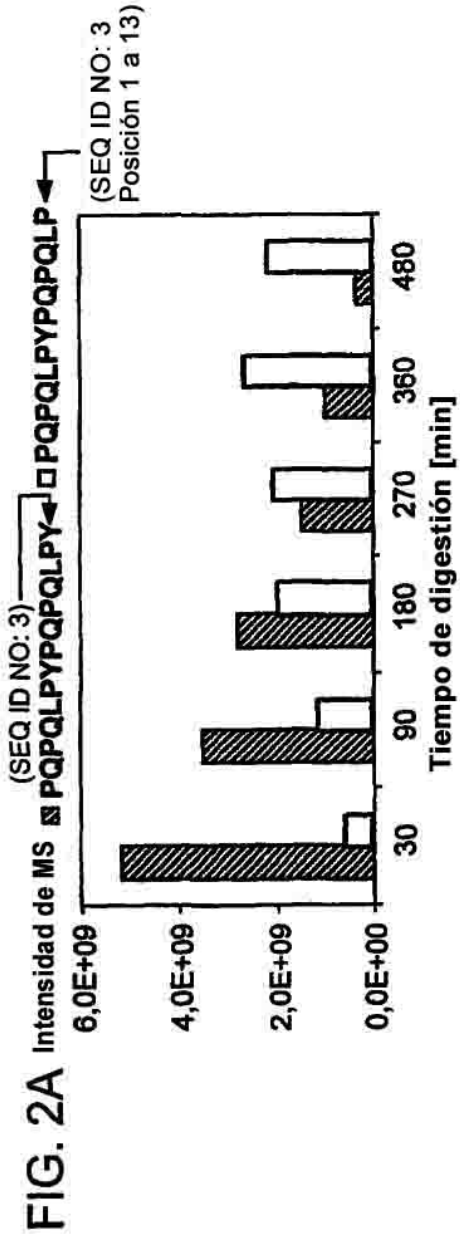


FIG. 3

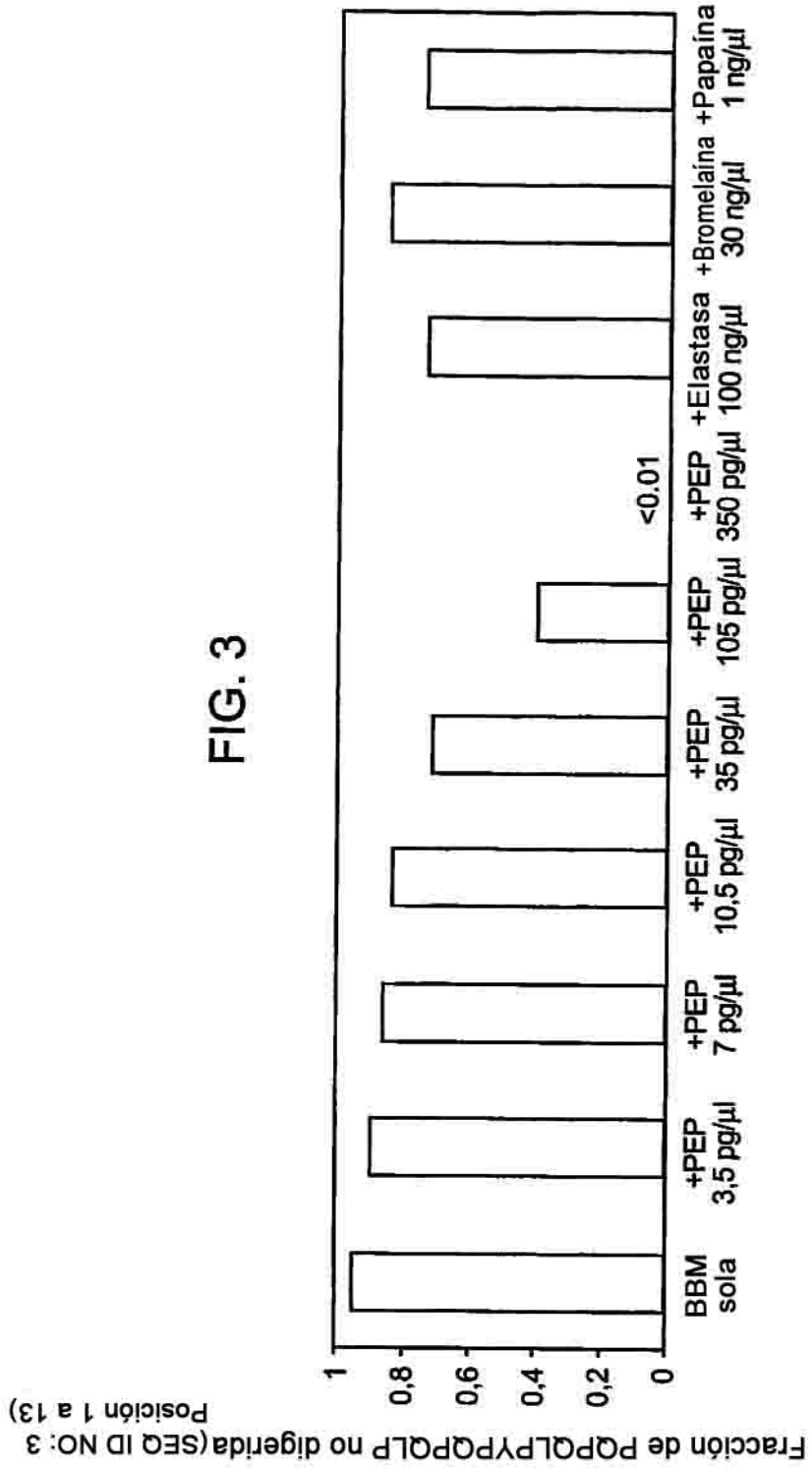


FIG. 4

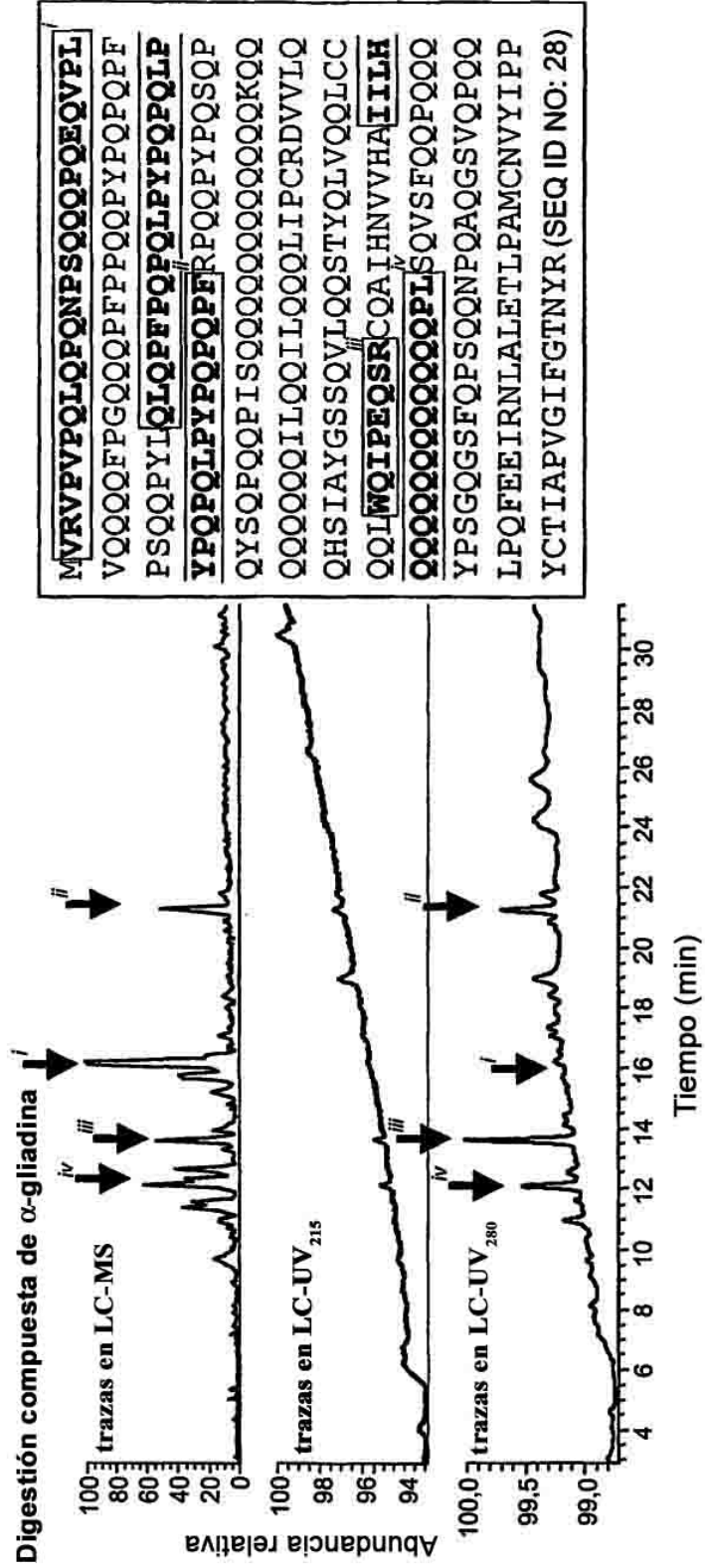


FIG. 5

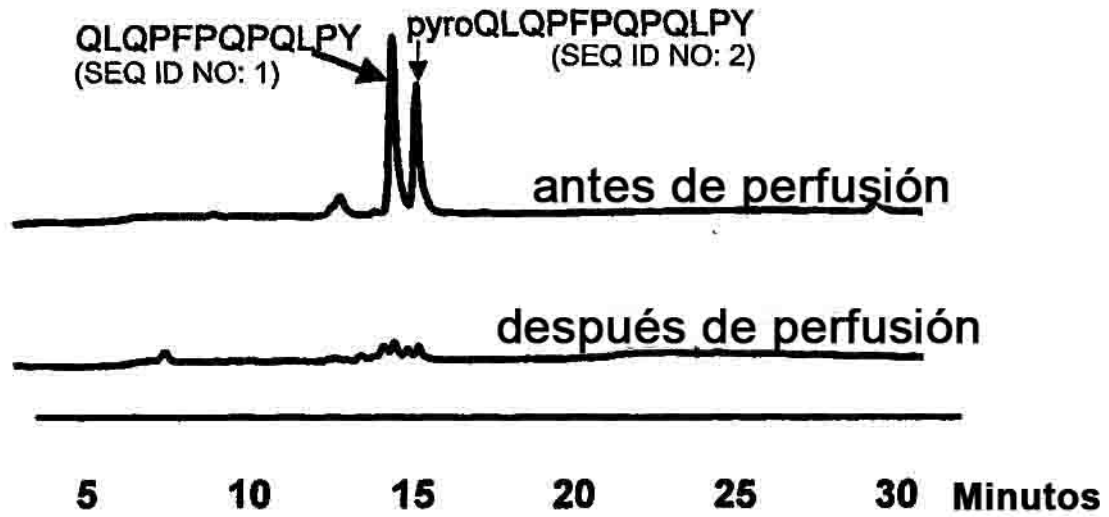
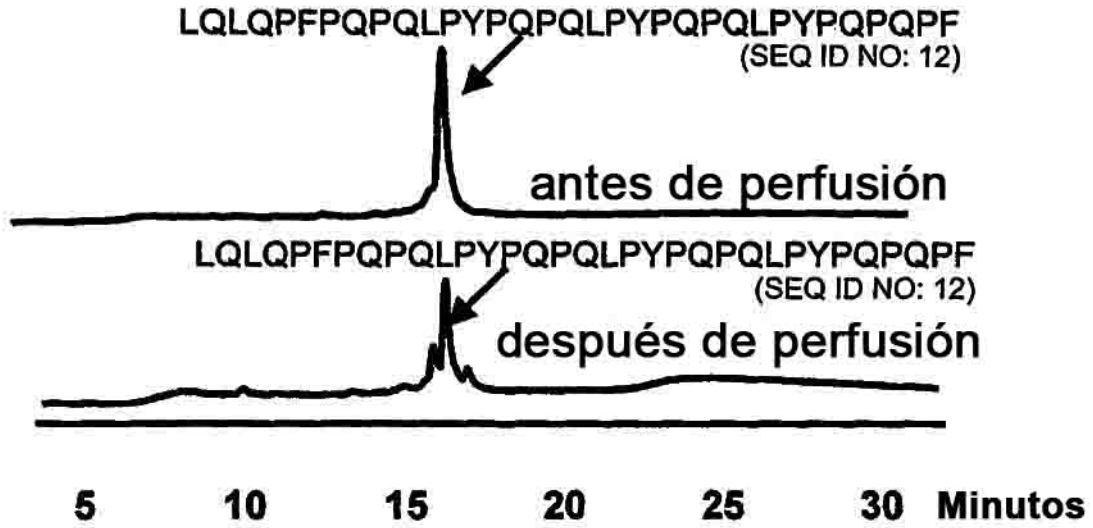


FIG. 6

