

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 228**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/564** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08748781 .5**  
96 Fecha de presentación: **25.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2149051**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.2010**

54 Título: **Método e inmunoabsorbentes para la detección específica y la absorción de anticuerpos asociados a la celiaquía y a la dermatitis herpetiforme**

30 Prioridad:  
**30.05.2007 DE 102007025291**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.08.2012**

73 Titular/es:  
**EUROIMMUN MEDIZINISCHE  
LABORDIAGNOSTIKA AG  
SEEKAMP 31  
23560 LÜBECK, DE**

72 Inventor/es:  
**PROBST, Christian;  
SCHLUMBERGER, Wolfgang;  
STÖCKER, Winfried;  
DÄHNRIK, Cornelia;  
KOMOROWSKI, Lars y  
MOTHES, Thomas**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 386 228 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

Método e inmunosorbentes para la detección específica y la absorción de anticuerpos asociados a la celiaquía y a la dermatitis herpetiforme.

5 La presente invención se refiere a los péptidos de fusión que se derivan de componentes de la gliadina, a los reactivos de ensayo para la detección diagnóstica de anticuerpos contra estos péptidos y a los procedimientos para la inmunosorción de tales anticuerpos para la terapia de la celiaquía y de la dermatitis herpetiforme.

Estado actual de la técnica:

10 En los pacientes con intolerancia al gluten (enteropatía sensible al gluten; niños pequeños: celiaquía, adultos: esprue endémico; celiaquía se utiliza también en el marco de la presente solicitud como sinónimo de la enteropatía sensible al gluten dependiente de la edad) por el consumo de productos de cereales que contienen gluten se provoca un deterioro de la mucosa del intestino delgado. Se llega a una atrofia de las vellosidades y a perturbaciones funcionales. El cuadro clínico está marcado por la diarrea y las consecuencias de la malabsorción (especialmente pérdida de peso; en niños retraso del crecimiento). En algunos pacientes con enteropatía sensible al gluten existe adicionalmente una dermatitis herpetiforme de Dühring: una enfermedad crónica de la piel que transcurre con formación de ampollas, pero que también puede aparecer por sí sola.

15 Una importante contribución para el diagnóstico de la enteropatía sensible al gluten y de la dermatitis herpetiforme de Dühring la aporta el examen de dos anticuerpos diferentes: anti gliadina y anti transglutaminasa tisular. Éste asegura el diagnóstico clínico y, además, es adecuado para el control de su transcurso y para el control de una dieta exenta de gluten o de una prueba de carga de gluten. Una diferenciación específica de estos dos anticuerpos a partir del plasma de los pacientes puede conllevar un efecto terapéutico positivo.

20 Durante la fase aguda de la enfermedad de la enteropatía sensible al gluten, así como en la dermatitis herpetiforme se pueden detectar generalmente anticuerpos de gliadina de las clases IgA e IgG. Eventualmente, también se pueden detectar anticuerpos de la clase IgM, pero por lo regular sólo cuando se presentan también al mismo tiempo anticuerpos anti gliadina de las clases IgA e IgG.

25 Al comienzo de una dieta exenta de gluten los anticuerpos IgA anti gliadina disminuyen ya al cabo de unos pocos meses a valores bajos, mientras que los anticuerpos de la clase IgG persisten por lo regular durante más tiempo. Niveles permanentemente elevados de anticuerpos IgA anti gliadina significan que no se sigue una dieta exenta de gluten. Bajo carga de gluten, en el caso de una recidiva, se llega en el espacio de unos pocos días a un incremento de los anticuerpos IgG anti gliadina, los anticuerpos IgA siguen algo más tarde.

30 La función fisiológica de la transglutaminasa tisular consiste en la catálisis de la formación de un enlace isopeptídico entre un grupo  $\gamma$ -carboxamida de un grupo glutamina y el grupo  $\epsilon$ -amino de un radical lisina de las proteínas de la matriz extracelulares, por lo que éstas se reticular en cruz (Aeschlimann et al. 2000 *Connective Tissue Res.* 41:1-27; Gentile et al. 2002. *Neurochem Int.* 40: 79-83).

35 Las gliadinas ricas en glutamina ingeridas con el alimento se pueden modificar igualmente después de la resorción por la glutaminasa tisular. Sin embargo, aquí tiene lugar preferentemente la desamidación enzimática de radicales glutamina a radicales glutamato (recopilado en Schwertz et al. 2004 *Clinical Chemistry* 50:2370-2375). Ésta da lugar a una unión más fuerte de los péptidos de gliadina a moléculas de clase MHC II y, por ello, a una estimulación incrementada de células T en pacientes con celiaquía (Sjöström et al. 1998. *Scand J Gastroenterol.* 48: 111-115; Molberg et al. 1998. *Nat Med.* 4:713-717).

40 Como epítipo importante para anticuerpos de la clase IgA, especialmente de partes de la gliadina desamidada, se identificó el tripéptido prolina-glutamato-glutamina (PEQ) (Osman et al. 2000. *Clin. Exp. Immunol.* 121:248-254). Se puso de manifiesto, que la gliadina desamidada es reconocida por los anticuerpos de pacientes con celiaquía de forma más específica que la gliadina no modificada (Aleanzi et al. 2001. *Clin Chem.* 47:2023-2028). Para la detección de anticuerpos contra un péptido desamidado derivado de la gliadina en el caso de celiaquía, se obtuvo por los autores, para anticuerpos de la clase IgA, una sensibilidad de 95,0% con una especificidad de 86,7% y para anticuerpos de la clase IgG, una sensibilidad de 90,0% con una especificidad de 86,7%, en relación a una enfermedad de celiaquía (véase tabla 1,a).

45 En el marco de un análisis sistemático de la unión de anticuerpos asociados a la celiaquía de la clase IgA a antígenos sintéticos, presuntamente derivados de la gliadina, se identificaron dos nonapéptidos correspondientes a la secuencia SEQ-ID NO 2 (Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro) y SEQ-ID NO 3 (Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu) como antígenos mejor adecuados. (Schwertz et al. 2004. *Clinical Chemistry* 50:2370-2375. La síntesis de estos dos péptidos (según Kramer et al. 1998. *J. Methods Mol. Biol.* 87:25-39) tuvo lugar químicamente por separado, uno al lado de otro, sobre una membrana de celulosa que fue empleada a continuación directamente en un ensayo quimioluminiscente para la unión de anticuerpos asociados a la celiaquía. El procedimiento es conocido a partir de la preparación de bancos de péptidos basados en membrana en el marco de estudios de mapas de epítipos. Los correspondientes reactivos para la detección de anticuerpos en la producción de sistemas de ensayo diagnósticos conducen a elevados costes de producción.

Prescindiendo de ellos, Schwertz et al. realizaron dos ELISA basados en membrana para la detección de anticuerpos de la clase de inmunoglobulinas IgA antigliadina en el caso de celiaquía, con detección por quimioluminiscencia, los cuales en una evaluación combinada de los dos antígenos correspondientes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 mostraron conjuntamente (véase tabla 1. b) una sensibilidad de 94,2% con una especificidad de 93,4%.

La detección por quimioluminiscencia es compleja y está obligada a caros aparatos de análisis. No se indicó, si los datos de resultados diagnósticos podían ser alcanzados también con los procedimientos de detección colorimétricos, ampliamente extendidos. Los propios autores señalan esta desventaja y proponen para la ulterior mejora de su sistema de ensayo una nueva optimación de la secuencia, así como la comprobación del sistema de quimioluminiscencia basado en membrana en el formato de placas para microtitulación, sin haber resuelto este problema.

Schwertz et al. sólo incluyeron en el estudio sus seros positivos de transglutaminasa tisular IgA. Las muestras de pacientes con carencia selectiva de IgA no conducen en el caso de Schwertz et al. a una disminución de la sensibilidad como en el caso de una selección de pacientes de resultados abiertos, de manera que aquí hay que suponer una sensibilidad demasiado alta, realizada incorrectamente, del orden de medidas de 3-5%. Los datos de los resultados se basan, además, en una evaluación combinada de dos determinaciones separadas, de mala validez para rutinas, basadas en las secuencias peptídicas SEQ ID NO 2, respectivamente SEQ ID NO 3.

Un ELISA basado en placas para microtitulación para la determinación de anticuerpos de la clase IgG en base de uno (conforme a la secuencia SEQ ID NO 2) de los dos nonapéptidos demostró igualmente en un estudio (Prause et al. 2007. Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung, Bochum) una mejora frente al estado actual de la técnica para la determinación de anticuerpos de la clase IgG, para IgA no se mostraron resultados (véase tabla 1, c).

En el estudio de Schwertz et al. se ha puesto de manifiesto, que la determinación de anticuerpos llevada a cabo por separado, pero evaluada de forma combinada empleando los péptidos conformes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, hace posible una mejora del diagnóstico serológico de la celiaquía. Los datos de los resultados del trabajo de Aleanzi et al. fueron superados claramente por Schwertz et al. Pero en el caso de Schwertz et al. se tienen que hacer al menos dos síntesis y determinaciones separadas (antígenos correspondientes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3), lo cual ocasiona el doble coste en material y trabajo. Sería posible mezclar los dos antígenos peptídicos y emplear la mezcla para el recubrimiento de la fase sólida en el ELISA. Pero tales ensayos están afectados por una escasa reproducibilidad, un incremento de las reacciones no específicas y un impedimento estérico recíproco en la unión de los componentes antigénicos a la superficie.

	Clase de inmunoglobulina	Sensibilidad	Especificidad	Fuente
A	IgA	85,0%	86,7%	Aleanzi et al., 2001 SEQ ID NO 1
	IgG	90,0%	86,7%	
b*	IgA	≤ 94,2%	93,4%	Schwertz et al., 2004 SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3
	IgG	insuficiente?	insuficiente?	
c	IgA	insuficiente?	insuficiente?	Prause et al., 2007 SEQ ID NO 2
	IgG	95,0%	94,7%	

\* elección de pacientes incorrectamente preseleccionada

Tabla 1: Compilación de los datos de los resultados publicados de los sistemas de ensayo basados en antígenos peptídicos de homólogos desamidados de gliadina.

Objeto de la invención era superar las desventajas del estado actual de la técnica, anteriormente descritas, y poner a disposición un sistema de ensayo de anticuerpos de mejor utilidad para rutinas, que proporcione resultados competentes.

Descripción de la invención

Este problema se soluciona por el objeto de las reivindicaciones, especialmente por los polipéptidos de fusión descritos a continuación.

Del estado actual de la técnica se puede deducir que con ayuda de los péptidos individuales según SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 es posible un diagnóstico competente de la celiaquía. Por ello, los autores sintetizaron estos dos péptidos, primero químicamente en forma biotinizada y los emplearon para el recubrimiento de placas para microtitulación. Por la detección de biotina ligada se pudo asegurar que los péptidos se habían ligado a la superficie,

sin embargo no fue posible volver a ratificar los parámetros de resultados diagnósticos derivados del estado actual de la técnica. Por consiguiente, iniciaron los ensayos con los péptidos sintetizados químicamente conforme a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3.

5 Como alternativa a la síntesis química hubiera sido posible expresar los péptidos conformes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 de forma recombinante (véanse ejemplos 1 y 2) y, por cierto, en forma de varias copias fusionadas, separadas respectivamente entre sí por radicales metionina, en cuya zona podían ser separadas mediante bromuro de cianógeno para su aislamiento. Entonces se habrían separado los componentes, se hubieran llevado a cabo en cada caso ELISA individuales y se hubieran utilizado paralelamente para el diagnóstico o se habría realizado el recubrimiento con la mezcla.

10 Pero los inventores han perseguido la idea de combinar conjuntamente los péptidos conforme a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 para dar un nuevo péptido de fusión conforme a SEQ ID NO 4 (Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu). Varias copias de estos péptidos de fusión debían ser sintetizados, unidos entre sí, y una vez realizada la síntesis recombinante, los péptidos debían ser aislados de nuevo. Sintetizaron un correspondiente ADN y lo integraron en forma trómera en un plásmido de expresión de E. coli, de manera que  
15 obtuvieron el plásmido circular conforme a SEQ ID NO 6 (véase ejemplo 1). Con ayuda de este plásmido pudieron expresar en E. coli el polipéptido conforme a SEQ ID NO 7, designado en lo sucesivo como trímero, purificarlo (véase ejemplo 2) y, a continuación, tal como se esperaba, escindir por tratamiento con bromuro de cianógeno. El producto de la escisión (monómero) lo emplearon para el recubrimiento de placas para microtitulación. Paralelamente a esto, bajo condiciones idénticas, llevaron a cabo controles con el trímero sin escindir.  
20 Sorprendentemente, con el trímero como sustrato antigénico, obtuvieron en el ELISA con detección colorimétrica (véase ejemplo 3) datos de resultados sensiblemente mejores para la clase de inmunoglobulina IgG para la identificación de pacientes de celiaquía que con los sistemas de ensayo del estado actual de la técnica, altamente desarrollados (véase tabla 2).

25 También con los monómeros que se obtuvieron por escisión del trímero, ya se pudieron superar en ensayos previos los datos de resultados de los sistemas ELISA del estado actual de la técnica, pero los mejores resultados se obtuvieron con el trímero sin escindir. Los antígenos peptídicos de más de 3 secuencias polipeptídicas conforme a SEQ ID NO 4 pueden alcanzar igualmente notables datos de resultados.

30 Para la obtención de los datos de resultados del ELISA en base del polipéptido conforme a SEQ ID NO 7 (trímero) los autores llevaron a cabo, a continuación, un estudio con muestras de suero de personas con diagnóstico positivo o, respectivamente, negativo de celiaquía, asegurado por biopsia (véase ejemplo 3). A diferencia de Schwertz et al., el colectivo de pacientes no fue seleccionado previamente, es decir que los pacientes con carencia selectiva de IgA no fueron excluidos. El colectivo se componía de la manera siguiente:

Grupo 1: pacientes de celiaquía sin dieta especial en el momento de la biopsia (Marsh 2-3). Este grupo comprende también pacientes con dermatitis herpetiforme.

35 Grupo 2: pacientes con dermatitis herpetiforme, en los cuales no se reconoce celiaquía alguna.

Grupo 3: pacientes en los cuales el examen por biopsia frente a una celiaquía es positivo

Grupo 4: pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), en los cuales se efectuó un examen por biopsia del intestino delgado y en el cual no se describieron modificaciones típicas de la celiaquía.

40 El grupo 1 se clasificó como celiaquía positiva, clínicamente confirmada, el grupo 2 como dermatitis herpetiforme positiva, clínicamente confirmada, y los grupos 3 y 4, como grupos de control negativos para la determinación de los parámetros de resultados por análisis de señal mediante las curvas características de "Receiver Operating Characteristic" (ROC).

45 Resultados: tal como se reproduce en la tabla 2, se pone de manifiesto que el ELISA basado en el polipéptido conforme a SEQ ID NO 7 manifiesta una sensibilidad y especificidad más elevadas para la detección de anticuerpos específicos de celiaquía de la clase IgG que en el ensayo descrito por Prause et al. Además de esto, con el mismo ELISA conforme a la invención también es posible una determinación de anticuerpos de la clase IgA, de alto valor cualitativo.

50 Los autores pudieron demostrar que por la unión de las secuencias peptídicas conformes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 para dar un péptido conforme a SEQ ID NO 7 se pueden preparar antígenos, que son adecuados como sustratos para ELISA fuertes, fáciles de producir, con detección colorimétrica. Con sistemas de ensayo, que contienen sustratos de antígenos conformes a la invención, se pueden detectar anticuerpos asociados a la celiaquía de forma más sencilla, más segura y con gran exactitud frente al estado actual de la técnica. Además de esto, el procedimiento conforme a la invención también posibilita la detección específica de anticuerpos de la clase IgA e IgG  
55 en pacientes con dermatitis herpetiforme (Véase Tabla 2).

		Sensibilidad	Especificidad
Celiaquía	IgA	80,8%	94,6%
	IgG	98,0%	96,0%
Dermatitis herpetiforme	IgA	66,7%	94,6%
	IgG	66,7%	96,0%

Tabla 2: parámetros de resultados del ELISA conforme a la invención en cuanto al diagnóstico de una celiaquía, respectivamente de una dermatitis herpetiforme aislada.

5 En lo referente al diagnóstico de la celiaquía, los autores consiguieron, con un reactivo correspondiente a la invención (variante SEQ ID NO 7, trímero) para la detección de anticuerpos asociados a la celiaquía de la clase IgG, una sensibilidad de 98,0% con una especificidad de 96,0%. Estos valores se sitúan claramente por encima de los mejores datos publicados hasta el momento (Prause et al.: sensibilidad 95,0%, especificidad 94,7%).

10 En lo que se refiere a anticuerpos de la clase IgA, la sensibilidad es del 80,8% y con ello se sitúa por debajo de los datos publicados por Aleanzi et al. y Schwertz et al. (véase tabla 1 a y b). Sin embargo, Aleanzi et al. alcanzaron una especificidad insuficiente, del 86,7%, y se sitúan por tanto, tomando conjuntamente la especificidad y la sensibilidad en referencia a IgA, a igual altura que nuestros resultados. Además, a los valores de Schwertz et al. sólo se puede acudir comparativamente, bajo condiciones, puesto que el colectivo de pacientes se había seleccionado previamente. La renuncia a pruebas de pacientes con carencia selectiva de IgA (aproximadamente el 3% de los enfermos de celiaquía; Challacombe et al. 1995. Arch. Dis. Childhood 73:3-7; véase la observación en tabla 1) refleja en el caso de Schwertz et al. una sensibilidad de diagnóstico demasiado elevada, la cual no se puede reproducir así en un colectivo no preseleccionado. Además, el sistema de ensayo de Schwertz et al. no se puede emplear para una producción industrial.

20 Para la clase de inmunoglobulinas IgG, se confirmó claramente la superioridad de un antígeno diana conforme a la invención frente al estado actual de la técnica. Puesto que según toda experiencia, en el caso de celiaquía y dermatitis herpetiforme los anticuerpos anti gliadina de la clase de inmunoglobulina IgA e IgG están dirigidos contra iguales epítomos de antígenos, hay que partir del hecho de que también para IgA, utilizando el material de pruebas del idéntico colectivo de pacientes en los sistemas de ensayo del estado actual de la técnica y de la presente invención, se pueden obtener para estos últimos los mejores parámetros de resultados.

25 Los antígenos conformes a la invención son técnicamente fáciles de preparar en cantidad suficiente y de la mejor calidad. Se pueden ligar sin más a superficies definidas. Son adecuados, entre otras cosas, pero no exclusivamente, para inmunoensayos en fase sólida y en procedimientos terapéuticos cromatográficos de inmunospecificidad.

30 Objeto de la invención es un polipéptido que contiene en sucesión arbitraria uno o varios péptidos correspondientes a SEQ ID NO 2 y uno o varios péptidos correspondientes a SEQ ID NO 3, comprendiendo el polipéptido uno o varios polipéptidos constituidos por al menos diez, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 aminoácidos sucesivos en SEQ ID NO 4, o que comprende uno o varios polipéptidos conforme a SEQ ID NO 4. En este caso, en lugares arbitrarios se pueden haber suprimido hasta 30% de los aminoácidos o reemplazado por aminoácidos arbitrarios y/o que SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 se solapen en parte, por lo que la actividad del polipéptido debería permanecer comparable, en particular la unión a anticuerpos específicos de celiaquía y dermatitis herpetiforme. El polipéptido puede contener especialmente 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, especialmente sus sustituciones conservativas de aminoácidos, o deleciones (repartidas sobre las dos secuencias, especialmente 1, 2 o 3 sustituciones o deleciones de aminoácidos por cada secuencia).

40 Obviamente, el polipéptido puede contener también otras secuencias. En una forma de ejecución, más del 50% del péptido se debe atribuir a una de las secuencias según SEQ ID NO 2 ó 3. Se pueden añadir especialmente hasta 30% o hasta 40% de aminoácidos arbitrarios. Éstos pueden servir, por ejemplo, para una purificación más sencilla del péptido (por ejemplo His-Tag, Flag-Tag o análogos), para una mejor estabilidad o para una accesibilidad más sencilla para los anticuerpos (por ejemplo como espaciadores entre las secuencias de epítomos). Obviamente, puede haber contenidos otros epítomos utilizables para el diagnóstico o la terapia de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, por ejemplo de transglutaminasas tisulares.

45 Los polipéptidos pueden contener también, alternativamente, sólo una copia de las respectivas secuencias peptídicas, pero especialmente contienen secuencias peptídicas correspondientes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, es decir respectivamente un gran número de copias. Tales polipéptidos comprenden preferentemente dos o más, especialmente tres o más o tres a veinte o 4 a 10 copias de las respectivas secuencias. En este caso, el número de copias de SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 puede ser igual o también diferente, y las secuencias en parte se pueden solapar entre sí, pero no tienen que hacerlo. Por ejemplo, se pueden presentar 2 copias de SEQ ID NO 2 y 3 copias de SEQ ID NO 3 o viceversa.

La unidad más pequeña del polipéptido preferido conforme a la invención contiene los péptidos conformes a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, descritos por Schwertz et al., en una secuencia que se solapa entre sí conforme a SEQ ID NO 4.

5 Por t anto, en comparación c on S chwertz et al. no se t ienen qu e efectuar dos ensayos paralelos. Las formas multiméricas de la unidad conforme a la invención, especialmente de la unidad más pequeña, después de haber sido acopladas a una superficie, ofrecen una seguridad más elevada que las formas monómeras, puesto que se dispone de s uficientes epí topos para l a r eacción con los anticuerpos es pecíficos y t odavía qu edan s iempre s obrantes algunos, si existen zonas del polipéptido que han quedado inaccesibles para la reacción de ligamiento a la superficie.

10 El sa lto de c alidad al canzado nuevamente e n l a pr esente i nvención frente a l est ado actual de l a t écnica es probablemente máximo en las nuevas secuencias peptídicas conformes a SEQ ID NO 4, respectivamente SEQ ID NO 7. E stas secuencias peptídicas frente al est ado act ual de l a t écnica se han d e co nsiderar co mo de nu eva calidad. Los polipéptidos con más o menos de tres copias del péptido conforme a SEQ ID NO 4, especialmente con 2 o más, tres o más, o 4 o más copias, así como de péptidos parciales constituidos por al menos diez, al menos 14, 15 al menos 15 o al menos 16 aminoácidos que se suceden uno tras otro en SEQ ID NO 4, se pueden emplear como el polipéptido conforme a SEQ ID NO 7 y muestran preferentemente una unión comparable de los anticuerpos.

20 Para los polipéptidos constituidos por la sucesión y número arbitrario de polipéptidos conforme a SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, así como también con o sin solapamientos de las secuencias, cabe esperar con el polipéptido de fusión conforme a SEQ ID NO 4 propiedades comparables en lo referente al ligamiento de anticuerpos específicos de celiaquía y dermatitis herpetiforme.

El experto en la materia sabe que se pueden generar derivados fisicoquímicamente parecidos a los polipéptidos descritos hasta ahora por una o varias sustituciones conservativas de aminoácidos (glutamato por aspartato E->D, glutamina por asparagina Q->N, fenilalanina por tirosina F->Y, leucina por isoleucina L->I) en posiciones arbitrarias. También estos derivados son objeto de la invención y están siempre incluidos en el merco de la invención, puesto 25 que cabe esperar propiedades comparables en lo referente al ligamiento de anticuerpos específicos de celiaquía y dermatitis herpetiforme. P or pr opiedades comparables el e xperto e n l a m ateria e ntiende una e especificidad y sensibilidad parecidas, especialmente para la detección diagnóstica de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, como se indica en la tabla 2 para la detección de IgA y/o IgG (-2% o mejor o preferentemente -1% o mejor), especialmente la u nión de los anticuerpos es por tanto comparable co n l a unión al polipéptido de fusión se gún SEQ ID NO 7. 30 Especialmente, se pueden sustituir hasta el 10%, hasta el 20% o hasta el 30% de los aminoácidos por una o varias sustituciones conservativas de aminoácidos, siendo comparable la unión de los anticuerpos específicos de celiaquía y dermatitis herpetiforme.

En una forma de ejecución preferida un polipéptido conforme a la invención contiene al menos una y como máximo 20 co pias de l a se cuencia c onforme a S EQ I D NO 4. E n un a f orma de e jecución p articularmente preferida un 35 polipéptido conforme a la invención contiene al menos dos y como máximo diez copias de la secuencia conforme a SEQ ID NO 4 o al menos tres copias de la secuencia conforme a SEQ ID NO 4. En otra forma de ejecución se emplea una mezcla de diferentes polipéptidos conformes a la invención.

Los polipéptidos conformes a l a i nvención se pu eden pr esentar t ambién en f orma de pol ímeros, es pecialmente 40 polímeros que comprenden 2 a 20 o 3 a 10 polipéptidos conformes a la invención. Éstos no tienen que estar unidos entre sí por una unión peptídica, sino que también pu eden estar acoplados co valentemente de o tra manera (por ejemplo a través de un grupo de unión) o asociados de forma no covalente.

Para el experto en l a m ateria exi sten ot ros procedimientos para l a pr eparación, pur ificación y a íslamiento de l os polipéptidos recombinantes co nformes a l a i nvención, co n o si n p artícipes de l a f usión c omo, por e jemplo, 45 procedimientos de f iltración, cr omatografía, el ectroforesis y c entrifugación o l a co mbinación d e ést os. T ales procedimientos para la purificación de proteínas se describen, por ejemplo en Lottspeich y Zorbas (Bioanalytik, 1998, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín) o Sambrook et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Por ello, también son objeto de la invención los polipéptidos conformes a la invención preparados, purificados o aislados con estos procedimientos. En una forma de ejecución preferida, el polipéptido conforme a la invención se prepara de forma recombinante en *E. coli*.

50 Por consiguiente, objeto de la invención son también los ácidos nucleicos (ADN ó ARN), que c odifican para uno o varios polipéptidos de fusión conformes a la invención, por ejemplo para un polipéptido que comprende un péptido conforme a SEQ ID NO 4 ó SEQ ID NO 7. Éstos pueden estar presentes en un vector de expresión bajo el control de un promotor heterológico. El vector de expresión puede estar contenido en una célula huésped. En el marco de la invención se ha puesto de manifiesto que, por ejemplo *E. coli* es adecuado para la expresión de los polipéptidos de 55 fusión conformes a la invención.

También son objeto de la invención los polipéptidos conformes a la invención marcados con una molécula reportera. Como procedimientos químicos de acoplamiento, son conocidos por el experto en la materia una serie de diferentes procedimientos como los que proveen a las moléculas reporteras primeramente con un grupo reactivo, por ejemplo

pentafluorfeniléster, N-hidroxisuccinimida o maleimida y, después, las moléculas reporteras así provistas se ponen en contacto con la molécula diana a marcar, por ejemplo un antígeno o una proteína. Después de la unión de la molécula reportera y la molécula diana, se pueden separar a continuación las moléculas reporteras en exceso mediante técnicas de separación químicas, bioquímicas o físicas, respectivamente por cromatografía o filtración.

5 Como moléculas reporteras se conocen al experto en la materia una serie de compuestos diferentes tales como fluoróforos, respectivamente fluoresceína o tetrametilrodamina, haptenos, por ejemplo biotina o His-Tag y enzimas, por ejemplo peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalinas. Para el empleo de los diferentes procedimientos de acoplamiento se pueden adquirir comercialmente para este fin moléculas reporteras ya activadas.

10 El experto en la materia conoce otras moléculas reporteras y otros procedimientos de acoplamiento para el marcado de proteínas. Por ello, también son objeto de la invención los polipéptidos marcados con moléculas reporteras, preparados con tales procedimientos.

Objeto de la invención son también los polipéptidos conformes a la invención que están unidos directa o indirectamente con una fase sólida (por ejemplo un soporte de plástico tal como una placa para microtitulación, una bolita magnética, una membrana por ejemplo de nitrocelulosa).

15 Objeto de la invención son también los procedimientos para el diagnóstico de celiaquía y/o hepatitis herpetiforme, en los cuales una muestra biológica líquida de un paciente (especialmente sangre, plasma o una muestra de heces opcionalmente diluida con agua o con una solución tampón adecuada) se pone en contacto con polipéptidos conformes a la invención, efectuándose o pudiendo efectuarse la unión de anticuerpos de la muestra biológica a estos polipéptidos, por lo que mediante la detección de estos anticuerpos contra uno de estos anticuerpos se puede diagnosticar una celiaquía o dermatitis herpetiforme. En estos procedimientos se puede utilizar una mezcla de al

20 menos dos polipéptidos diferentes conformes a la invención.

En el marco de la invención se puso de manifiesto que los polipéptidos conformes a la invención son particularmente adecuados para llevar a cabo procedimientos inmunológicos tales como por ejemplo Westernblot, LiniénBlot, Dot Blot o ensayos inmunofluorescentes. Objeto de la invención son por tanto también tales procedimientos, respectivamente procedimientos diagnósticos, en los cuales la unión de los anticuerpos se detecta con un ensayo de

25 inmunofluorescencia, Microarray, ELISA, ensayo de luminiscencia, Blot, ensayo radioinmune, Western Blot o Dot Blot.

La invención también pone a disposición un equipo de ensayo para la detección de anticuerpos, el cual comprende uno o varios polipéptidos conformes a la invención. Éste hace posible, por ejemplo, llevar a cabo un procedimiento diagnóstico conforme a la invención. Un equipo de ensayo de este tipo puede contener también anticuerpos secundarios, por ejemplo IgA antihumano y/o anticuerpos IgG antihumanos, los cuales opcionalmente pueden estar marcados con una molécula reportera. En una forma de ejecución, el equipo de ensayo comprende, además, antígenos que adicionalmente son adecuados para el diagnóstico de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, por

30 ejemplo transglutaminasa tisular o polipéptidos con epítopos de ellos, que sean adecuados para el diagnóstico. Con ello, el equipo de ensayo se puede utilizar, por ejemplo para un ensayo combinado, en el cual se detectan anticuerpos IgA antitransglutaminasa tisular y anticuerpos IgG contra los polipéptidos conformes a la invención.

Otro objeto de la invención es la utilización terapéutica de los polipéptidos para la separación de anticuerpos específicos de celiaquía de la sangre o plasma sanguíneo, preferentemente de pacientes con celiaquía y dermatitis herpetiforme. Esto se puede efectuar *ex vivo*, por ejemplo por inmunoadsorción (inmunaféresis) en polipéptidos

40 inmovilizados, conformes a la invención (conforme al ejemplo 4).

Por la puesta en contacto con la sangre o el plasma se separan los anticuerpos específicos para los polipéptidos inmovilizados y, a continuación, el líquido corporal se puede reemplazar de nuevo. Procedimientos correspondientes se describen, por ejemplo, para la terapia de la cardiomiopatía dilatativa en base de la secuencia de los receptores beta-andrenérgicos (Rönspeck et al. 2003 Ther Apher Dial. 7:91-97). En una forma de ejecución preferida, un polipéptido conforme a la secuencia SEQ ID NO 7 se inmoviliza por acoplamiento químico a una matriz sólida y se emplea como base para un inmunoensayo o para un procedimiento de absorción terapéutico por cromatografía de

45 inmunoafinidad.

Con ello, la invención prepara los polipéptidos para su utilización en la terapia de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, en la cual la sangre o plasma de un paciente se pone en contacto con uno o varios polipéptidos conformes a la invención ligados a una fase sólida, teniendo lugar la unión de los anticuerpos asociados a la enfermedad, de la sangre o plasma, a estos polipéptidos, de modo que la sangre o plasma empobrecida en anticuerpos es adecuada para la reinfusión al paciente. En este caso, en una forma de ejecución, los polipéptidos conformes a la invención se utilizan en combinación con polipéptidos con epítopos de la transglutaminasa tisular.

La invención se refiere también a la utilización de uno o varios de los polipéptidos descritos para la preparación de una composición farmacéutica, especialmente para la terapia de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme. Esta composición farmacéutica es especialmente adecuada para la unión / absorción de anticuerpos de diferentes clases (IgA, IgG) procedentes de sangre o plasma sanguíneo de pacientes.

55

**Ejemplo 1:** Clonación de pET24e-(Gliadin-rd)<sub>3</sub>

Preparación del fragmento del vector:

Primero se destruyó el único punto de corte *Adel* del plásmido pET24d (Novagen). La separación de los 3'-extremos colgantes de cadena sencilla tras la linearización-*Adel* del plásmido pET24d fue catalizada por la polimerasa Pfu (Fermentas) en ausencia de dNTP's. A continuación tuvo lugar la religación del fragmento del vector por T4-ADN-ligasa (Fermentas). Este plásmido de ADN fue amplificado a continuación con ayuda del ADN de los oligonucleótidos cebadores sentido pET24e (SEQ ID NO 8) y antisentido pET24e (SEQ ID NO 9) y, después de la restricción A del y desfosforilación de los extremos 5', se empleó como fragmento del vector pET24e para la incorporación de la secuencia sintética de ADN derivada de gliadina parcialmente desamidada.

Con ayuda de los ADN de los oligonucleótidos 5'-fosforilados sentido dpGlia (SEQ ID NO 10) y antisentido dpGlia (SEQ ID NO 11) se generó una secuencia de enlazador que porta extremos colgantes 5' fosforilados compatibles con *Adel* y dirigida a través de éstos se liga al fragmento del vector pET24e, cortado en *Adel* y desfosforilado con ayuda del ADN de la ligasa-T4 (Fermentas).

La hibridación del enlazador tuvo lugar en una tanda de 50 µl de la siguiente composición:

Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM

0,01% (v/v) de Tween 20;

MgCl<sub>2</sub> 2 mM de

1 µM sentido Glia-dp (SEQ ID NO 10)

1 µM antisentido Glia-dp (SEQ ID NO 11)

La tanda se incubó 1 minuto a 95°C y, a continuación, se enfrió hasta 25°C con una tasa de bajada de temperatura de 2°C por minuto.

Los fragmentos de enlazador hibridados se purificaron utilizando el extracto NucleoSpin\* del sistema de limpieza II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) de forma correspondiente a las instrucciones del fabricante y se recogieron en respectivamente 50 µl de Tris-HCl 5 mM, pH 8,5.

Los enlazadores portan a cada lado un extremo colgante 3'-ATG, por lo que es posible una incorporación dirigida en el vector pET24 cortado en *Adel*.

Los fragmentos de enlazador 5'-fosforilados y purificados se integraron a continuación por ligamiento en el plásmido pET24e cortado en *Adel*. Para el ligamiento se empleó el kit para ligación rápida de ADN de la sociedad Fermentas, de forma correspondiente a las indicaciones del fabricante. A continuación, la tanda de ligamiento se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene).

Se seleccionaron clones positivos en virtud de la resistencia a la kanamicina [50 µg/ml]. A partir de estos clones se aislaron los plásmidos contenidos y se examinaron por análisis de restricción y secuenciación del ADN. La secuencia de ADN que codifica para la proteína recombinante (péptido de fusión GAF(3X) análogo a la gliadina) según SEQ ID NO 7 está representada en SEQ ID NO 5 y la secuencia del ADN del plásmido de expresión completo con la designación pET24e-GAF(3x) está representada en SEQ ID NO 6. Se eligieron plásmidos correctos para la realización de la expresión, se inocularon en 20 ml de medio LB que contiene antibiótico y se incubaron a 37°C hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> (d=1 cm) de 0,6. Por adición de IPTG (concentración final: 1 mM) se induce la expresión de la proteína y, a continuación, durante otras 3 horas se incubó a 37°C. Después de este tiempo las células se sedimentan por centrifugación a 2.200 x g durante 10 minutos, se vuelven a suspender en 20 ml de PBS, se centrifugan de nuevo y finalmente se vuelven a suspender en 1 ml de PBS.

La ruptura de las células tiene lugar por adición de un tercio del volumen de 4 x tampón de muestra NuPAGE-LDS (Invitrogen), seguida de una incubación de 10 minutos a 70°C. El ADN cromosomal se fragmenta a continuación por tratamiento con ultrasonidos (Sonificador Branson, nivel 7, microTip).

El lisado celular se transfiere después de la separación por SDS-PAGE sobre una membrana de nitrocelulosa. A continuación se bloquean las posiciones no saturadas de la membrana por 15 minutos de incubación con "tampón universal" (EUROIMMUN) con 3% p/v de leche en polvo). A continuación, se incubó 1 hora con un anticuerpo monoclonal de ratón (Merck Bioscience GmbH) dirigido contra His-Tag y diluido 1:2000 en "tampón universal" con 3% (p/v) de leche en polvo. Después, se lava tres veces durante respectivamente 5 minutos con "tampón universal". En una segunda etapa de incubación, los anticuerpos que en caso positivo se han unido a las proteínas reaccionan con una solución del conjugado diluida 1:2000 en "tampón universal", la cual como conjugado contiene un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). A continuación, se lava con suero como después de la



incubación. En una tercera etapa de incubación se detectan entonces los anticuerpos ligados con una “solución sustrato” NBT/BCIP (cloruro de 4-tetrazolio nitro-azul / clorobromoindolilfosfato, EUROIMMUN).

5 En el Westernblot, en el caso de la expresión de la construcción (GAF)<sub>3</sub>(HIS)<sub>6</sub> conforme a SEQ ID NO 7, se puede detectar una proteína His-Tag-reactiva, cuya magnitud coincide bien con la masa de 7,9 kDa predicha en base de la secuencia de aminoácidos. Las células que contienen el vector del plásmido inalterado, no presentan ninguna proteína correspondiente.

**Ejemplo 2:** purificación del péptido de fusión GAF(3x) recombinante, trímico, análogo a gliadina, por cromatografía de afinidad

10 En el caso de la columna de afinidad, se trata de una columna de centrifugación (Spin) NINTA (Quiagen), que se manejó según recomendaciones del fabricante.

15 Las células recolectadas conforme al ejemplo 1 se centrifugaron de nuevo tal como se ha descrito, se volvieron a suspender en 1 ml de “tampón TNI-10” (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) y se rompieron por triple tratamiento con ultrasonidos durante 1 minuto (Sonificador Branson, nivel 7, MicroTip). Las proteínas insolubles se separaron por centrifugación a 21.250 x g durante 10 minutos. A continuación, 0,5 ml del sobrenadante se aplicaron sobre una columna de centrifugación NINTA, equilibrada con “tampón TNI-10”.

Las proteínas no o débilmente ligantes fueron separadas de la columna por múltiples lavados con 0,5 ml de “tampón TNI-10”. La elución se efectúa con 0,2 ml de “tampón TNI-150” (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM). La fracción de elución se analizó por Westernblot como en el ejemplo 1.

20 Los eluidos contienen esencialmente una proteína que, tras la tinción de la membrana de Westernblot con solución de tinción Ponceau-S, corresponde en cada caso a una banda correspondiente a una magnitud de 7,9 kDa. Según Westernblot, se puede ver una banda de la misma magnitud. Este resultado indica que la proteína expresada según la cromatografía está esencialmente libre de componentes de *E. coli*.

**Ejemplo 3:** ELISA para la determinación de anticuerpos específicos de celiaquía y dermatitis herpetiforme

25 Las placas para microtitulación de ELISA (Maxisorb, Nunc) se recubren con antígeno diluido en PBS, durante una noche a la temperatura ambiente. Como antígeno particularmente preferido los autores utilizaron un péptido de fusión recombinante, constituido por un nonapéptido desamidado de la gliadina, inmunológicamente dominante, enlazado con un octapéptido sintético homólogo de la gliadina (conforme a SEQ ID NO 7).

30 A continuación, las placas recubiertas con antígeno se lavan con PBS (0,1% de Tween 20) y durante 2 horas se bloquean con suero fetal de bovino en 10% de PBS. Después se vuelven a lavar las placas para microtitulación con Tween-20 en PBS-0,1%. La incubación de las placas se efectúa tal como se describe en las instrucciones de trabajo de EUROIMMUN. Los datos para la evaluación de resultados de este ELISA están recopilados en la tabla 2.

**Ejemplo 4:** procedimiento inmunoterapéutico para el tratamiento de la celiaquía y la dermatitis herpetiforme

35 El antígeno purificado conforme a la invención se acopla a una fase sólida y se emplea como material para cromatografía de afinidad en columna. El plasma de un paciente con celiaquía o dermatitis herpetiforme se hace fluir de manera continua por esta columna y, liberado de anticuerpos por purificación, se aporta de nuevo al paciente.

LISTA DE SECUENCIAS

<110>

<120> Procedimientos e inmunoabsorbentes para la detección y absorción específicas de anticuerpos asociados a la celiaquía y dermatitis herpetiforme

<130> 10 2007 025 291.0

<140> unknown

<141> 2007-05-30

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica D-2 conforme a Aleanzi et al. 2001. Clin Chem. 47:2023-2028

<400> 1

Gln Pro Glu Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Glu Arg Pro Phe  
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de nonapéptidos conforme a Schwertz et al. 2004. Clinical Chemistry 50:2370-2375

<400> 2

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro  
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de nonapéptidos conforme a Schwertz et al. 2004. Clinical Chemistry 50:2370-2375

<400> 3

Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu

1 5

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Péptidos de fusión sintéticos de SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3

<400> -

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

Glu

<210> 5  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Tres copias de los enlazadores de ADN realizados por hibridación de oligonucleóticos de ADN conforme a SEQ ID NO 10 y SEQ ID NO 11 se ligan en el vector pET24e del ADN linealizado en Adel. Se muestra la secuencia resultante que codifica para la proteína conforme a SEQ ID NO 7.

<400> 5  
 atggetcaca tgecgetgca gectgaacaa ccatttcccg aacaactgcc gcagtttgaa 60  
 gaaatgccgc tgcagcctga acaaccattt cccgaacaac tgcgcagtt tgaagaatg 120  
 ccgctgcagc ctgaacaacc atttcccgaa caactgccgc agtttgaaga aatggtgcac 180  
 caccaccacc accactga 198

<210> 6  
 <211> 5401  
 <212> DNA  
 <213> E.coli

<223> Vector de expresión pET24e-GAF (3x) usado como constructo de expresión del péptido GAF(3x)

<400> 6  
 ggggaattgt gageggataa caattcccct ctagaataa ttttgtttaa cttaagaag 60  
 gagatatacc atggetcaca tgcgcctgca gcctgaacaa ccatttcccg aacaactgcc 120  
 gcagtttgaa gaaatgccgc tgcagcctga acaaccattt cccgaacaac tgcgcagtt 180  
 tgaagaaatg ccgctgcagc ctgaacaacc atttcccgaa caactgccgc agtttgaaga 240  
 aatggtgcac caccaccacc accactgaga tccggetgct aacaaagccc gaaaggaagc 300  
 tgagttgget getgcccacg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctetaaacg 360  
 ggtcttgagg ggttttttgc tgaaggagg aactatatcc ggattggcga atgggacgcg 420  
 ccctgtagcg ggcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca 480  
 cttgccagcg cectagegcc cgetccttcc gctttcttcc ettcctttct cgeccagtte 540  
 gccggcttcc cccgtcaage tctaaatcgg gggctcccct tagggttccg atttagtget 600  
  
 ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcaegtgg gccatcgccc 660  
 tgatagacgg tttttcgcgc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg 720

ttccaaactg	gaacaaact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	780
ttgccgattt	cgccctattg	gtaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaat	taacgcgaat	840
tttaacaaaa	tattaacggt	tacaatttca	ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtagcgga	900
accctattt	gtttatTTTT	ctaaatcat	tcaaatatgt	atccgctcat	gaatatttc	960
ttagaaaaac	tcategagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	1020
accatatttt	tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca	1080
taggatggca	agatcctggt	atcggctcgc	gatccgact	cgtccaacat	caatacaacc	1140
tattaatttc	ccctcgtcaa	aaataagggt	atcaagttag	aaatcaccat	gagtgacgac	1200
tgaatccggt	gagaatggca	aaagtttatg	cattttcttc	cagacttggt	caacaggcca	1260
gccattacgc	tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaacccaa	cgtttattca	ttcgtgattg	1320
cgcttagcgg	agacgaaata	cgcgatcgct	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	1380
atgcaaccgg	cgcaggaaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	1440
ttcttetaat	acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtagta	acctgcatc	1500
atcaggagta	cgataaaaat	gcttgatggt	cggagagggc	ataaatcccg	tcagccagtt	1560
tagtctgacc	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	1620
caactctggc	gcategggct	tccatataca	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgc	1680
atctatcgca	gccatTTtat	accatataa	atcagcatcc	atgTTggaat	ttaatcgcg	1740
ectagagcaa	gactgttccc	gttgaatag	gctcataaca	ccccttgat	tactgtttat	1800
gtaaagcagc	agttttattg	ttcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	1860
gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	gatctctctg	agatcctttt	ttctcgccg	1920
taatctgctg	cttgcaaaaca	aaaaaccac	cgtaccacgc	ggtggtttgt	ttgcccgatc	1980
aaagactacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgag	ataccaaaata	2040
ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	2100
cataccctgc	tctgctaate	ctgttaccag	tggtgctg	cagtgccgat	aagtctgctc	2160
ttaccgggtt	ggaactcaaga	cgatagttac	cggataaggg	gcagcggctg	ggctgaaccg	2220
ggggttctgt	cacacagccc	agcttgaggc	gaacgaocata	caccgaactg	agatacctac	2280
agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgggag	ccgaaggggag	aaaggcggac	aggtatcccg	2340
taagcggcag	ggtcggaaaca	ggagagcgca	cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	2400
atctttatag	tctctcgggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	2460
cgtcaggggg	gcgagcccta	tggaaaaacg	ccagcaaccg	ggccttttta	cggttctctg	2520
ccTTTTgctg	gccTTTTgct	cacatgTTct	ttctcgctt	atccccgat	tctgtggata	2580
accgtattac	cgctttgag	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacc	accgagcgc	2640
cgagctcagt	gagcagggaa	gcccgaagagc	gctgatgccc	gtattttctc	cttacgcacc	2700
tgtagcggat	ttcacaccgc	atatatgggt	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	2760
atagTTaagc	cagtatacac	tccgctatcg	ctacgtgact	gggtcatggt	tgcccccga	2820
cacccgccaa	caccgcctga	cgcgcctcga	cgggcttctc	tgctcccggc	atccgcttac	2880
agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	ggttttcaec	gtcatcaccg	2940
aaacgcgcga	ggcagctcgc	gtaaaagctca	tcagcgtggt	cgtyaagcga	ttcacagatg	3000
tctgctctgt	catccgcgctc	cagctcgttg	agtttctcca	gaagcgttaa	tgctcggctt	3060
ctgataaaagc	gggccatggt	aagggcggtt	tttctctggt	tggtcactga	tgctcctgtg	3120
taagggggat	ttctgttcat	gggggtaatg	ataccgatga	aacgagagag	gatgctcacg	3180
atacggggtta	ctgatgatga	acatgccccg	ttactggaac	gtttgtgagg	taacaaactg	3240
gcggtatgga	tgcggcggg	ccagagaaaa	atcactcagg	gtcaatgcca	gcgctctggt	3300
ataacagatg	taggtgttcc	acagggtagc	cagcagcatc	ctgcgatgca	gatccgggaa	3360
ataaatggtgc	agggcgctga	cttcccggtt	tccagacttt	acgaaacacg	gaaaccgaag	3420
accattcatg	ttgTTgctca	ggctgcagac	gttttgacgc	agcagctcgt	tcacgttccg	3480
tcgctatcgc	gtgattcatt	ctgctaacca	gtaaggcaac	cccgccagcc	tagccgggtc	3540
ctcaacgaca	ggagcacgat	catgcgcacc	cgtggggccg	ccatgccggc	gataatggcc	3600
tgcttctcgc	cgaaacgTTt	ggtggcggga	ccagtgcgga	aggcttgagc	gagggcgtgc	3660
aagattccga	atacccgaag	cgacagggcg	atcatcgtcg	cgtccagcg	aaagcgggtc	3720
tcgccgaaaa	tgaccagag	cgtgcggcgc	acctgtccta	cgagttgcat	gataaagaag	3780
acagtataaa	gtgcggcgac	gatagtcag	ccccgcgcc	accggaagga	gctgactggg	3840
ttgaaggctc	tcaagggcat	cggtcagat	ccccggtgct	aatgagtgag	ctaacttaca	3900
taatttgcgt	tgccctcact	gcccgttctc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	3960
taatgaatcg	gccaaecgcg	ggggagagge	ggtttgcgta	ttgggcgcca	gggtggtttt	4020
tcttttcacc	agtgagacgg	gcaacagctg	attgcccttc	accgctggc	cctgagagag	4080
ttgcagcaag	cggtccacgc	tggtttgccc	cagcagggca	aaatcctggt	tgatgggtggt	4140
taacggcggg	atataacatg	agctgtcttc	ggtatcgtcg	tatcccacta	ccgagatata	4200
cgcaccaacg	cgcagcccg	actcggtaat	ggcgcgcat	gcgcccagcg	ccatctgatc	4260

```

gttggcaacc agcctcgcag tgggaacgat gccctccttc agcatttgca tggtttgttg 4320
aaaaccggac atggcactcc agtegccttc cegttcogct atcggetgaa tttgattgcy 4380
agttagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagAAC ttaatgggcc 4440
cgctaacagc gegatttget ggtgacccaa tgcgaccaga tgetccacgc ccagtcgcgt 4500
accgtcttca tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa 4560
taacgcgcga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcacccctgt catccagcgg 4620
atagttaatg atcagcccac tgacgcggtg cgcgagaaga ttgtgcaccg cegctttaca 4680
ggcttcgacg cegcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccga gttgatcggc 4740
gcgagattta atcgcgcgca caatttgcca cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc 4800
aacgccaatc agcaacgact gtttgccgcg cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta 4860
attcagctcc gccatcgcg cttccacttt ttcccgcggt ttccgagaaa cgtggctggc 4920
ctggttcacc acgcgggaaa cggctcgata agagacaccg gcatactctg egacatcgta 4980
taacggtact ggtttcacat tcaccaccct gaattgactc tctccgggc gctatcatgc 5040
cataccgcga aagggtttgc gccattcgat ggtgtccggg atctcgacgc tctcccttat 5100
gegactctg cattaggaag cagccagta gtaggttgag gccgttgag accgccgcg 5160
caaggaatgg tgcattgcaag gagatggcgc ccaacagtcc cccggccacg gggcctgcca 5220
ccatacccaac gcgaaacaa gcgctcatga gcccgaaagt gcgagcccga tcttccccat 5280
cggtagatgc ggcgatatag gcgcccagaa ccgcacctgt ggcgcgggtg atgcggccca 5340
cgatgcgtcc ggcgtagagg atcgagatct cgatcccgcg aaattaatac gactcactat 5400
a 5401

```

```

<210> 7
<211> 65
<212> PRT
<213> artificial

```

```

<220>
<223> Proteína de fusión recombinante que contiene un hexa-histigina-Tag C-
terminal para la purificación de la proteína y tres copias de la secuencia
sintética análoga a gliadina conforme a SEQ ID NO 4 interespaciada con un
radical sencillo de metionina.

```

```

<400> 7
Met Ala His Met Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Glu Gln Leu
1 5 10 15
Pro Gln Phe Glu Glu Met Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Glu
20 25 30
Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu Met Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe
35 40 45
Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu Met Val His His His His His
50 55 60

```

```

His
65
<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> oligonucleótido cebador del ADN sintetizado químicamente usado para
amplificar el fragmento pET24e por PCR.

```

<400> 8  
ctcacatggt gcaccaccac caccaccact gagatc 36

<210> 9  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido cebador del ADN sintetizado químicamente usado para amplificar el fragmento pET24e por PCR.

<400>  
gtgcaccatg tgagccatgg tatatctcct tottaaagtt aaac 44

<210> 10  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sentido de ADN 5'-fosforilado sintetizado químicamente que hibridiza con ADN oligonucleótido conforme a SEQ ID NO 11 para formar el enlazador a insertar en pET24e linearizado en Adel.

<400> 10  
ccgctgcagc ctgaacaacc atttcccgaa caactgccgc agtttgaaga aatg 54

<210> 11  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido de ADN 5'-fosforilado sintetizado químicamente que hibridiza con ADN oligonucleótido conforme a SEQ ID NO 10 para formar el enlazador a insertar en pET24e linearizado en Adel.

<400> 11  
ttcttcaaac tgcggcagtt gttcgggaaa tggttgttca ggctgcagcg gcat 54

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido, que contiene uno o varios péptidos conforme a SEQ ID NO: 2 y uno o varios péptidos conforme a SEQ ID NO: 3, habiéndose podido suprimir en cada caso hasta 30% de los aminoácidos o intercambiar por un reemplazamiento conservativos de aminoácidos, y/o pudiéndose solapar en parte SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, caracterizado porque comprende uno o varios polipéptidos constituidos por al menos 14, al menos 15 o al menos 16 aminoácidos sucesivos en SEQ ID NO 4, o que comprende uno o varios polipéptidos conforme a SEQ ID NO 4.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende tres polipéptidos conforme a SEQ ID NO: 4.
- 10 3. Polipéptido según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o varios polipéptidos conforme a SEQ ID NO: 7.
4. Polipéptido según una de las reivindicaciones precedentes en forma de un polímero que comprende 2 a 20 polipéptidos.
5. Polipéptido según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se prepara de forma recombinante o con medios bioquímicos convencionales de síntesis de polipéptidos.
- 15 6. Polipéptido según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque está unido con una molécula reportera o con una fase sólida.
7. Procedimiento para el diagnóstico de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, caracterizado porque una muestra biológica líquida de un paciente se pone en contacto con uno o varios polipéptidos según una de las reivindicaciones precedentes, pudiendo tener lugar la unión de los anticuerpos de la muestra biológica a estos polipéptidos, de modo que por la detección de anticuerpos contra uno de estos polipéptidos se diagnostica una celiaquía o una dermatitis herpetiforme.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que se utiliza una mezcla de al menos dos polipéptidos diferentes según una de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque la unión de los anticuerpos se detecta mediante un ensayo de inmunofluorescencia, Microarray, ELISA, un ensayo de luminiscencia, Blot, un ensayo radioinmune, Western Blot o Dot Blot.
- 25 10. Equipo de ensayo para la detección de anticuerpos, caracterizado porque comprende un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 6.
11. Polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización en la terapia de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme, caracterizado porque la sangre o el plasma de un paciente se pone en contacto con un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 7, teniendo lugar la unión de los anticuerpos asociados a la enfermedad, de la sangre o del plasma, al polipéptido por lo que la sangre o el plasma empobrecido en anticuerpos es adecuado para la reinfusión al paciente.
- 30 12. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 6.
13. Utilización de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 6 para el diagnóstico *in vivo* de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme.
14. Utilización de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento para la terapia de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme.
- 40 15. Ácido nucleico, que codifica para uno o varios polipéptidos según una de las reivindicaciones 1 a 6.