(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 286**

(21) Número de solicitud: 201131576

(51) Int. CI.:

C07K 7/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

29.09.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2013

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
PLAZA DE SANTA CRUZ, 5 BAJO
47002 VALLADOLID ES

(72) Inventor/es:

BERNARDO ORDIZ, David;
GARROTE ADRADOS, José Antonio;
BLANCO QUIRÓS, Alfredo Ramón;
ARRANZ SANZ, Eduardo y
CEBOLLA RAMÍREZ, Ángel

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **PÉPTIDO INMUNOGÉNICO DEL GLUTEN Y SUS APLICACIONES.**

(57) Resumen:

Péptido inmunogénico del gluten y sus aplicaciones.

La presente invención proporciona un péptido inmunogénico de ocho aminoácidos que se genera de forma natural en el intestino de los pacientes celiacos por la hidrólisis del gluten ingerido. Por tanto, la invención se refiere al uso de dicho péptido, o de anticuerpos generados frente al mismo, para el diagnóstico y/o seguimiento in vitro de la enfermedad celiaca, así como al uso de tales anticuerpos para la detección de gluten en alimentos. Son también objeto de la presente invención el uso del péptido mencionado como diana terapéutica para el desarrollo de compuestos o composiciones útiles para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de esta condición patológica, así como el uso de este péptido y de los anticuerpos frente al mismo para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

ES 2 402 286 A1

DESCRIPCIÓN

Péptido inmunogénico del gluten y sus aplicaciones

La presente invención se encuadra en el campo de la salud y de la alimentación, específicamente dentro de los péptidos inmunogénicos del gluten útiles para el diagnóstico, seguimiento y/o tratamiento terapéutico de la enfermedad celiaca en individuos, así como para la detección de gluten en alimentos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad celiaca es una enteropatía inducida por gliadina (prolamina del trigo) y otras prolaminas de cereales relacionados como secalina (centeno), hordeína (cebada) y algunos tipos de aveninas (avena) en individuos predispuestos genéticamente (HLA-DQ2/DQ8).

Actualmente, la inmunopatogénesis de la enfermedad celiaca se explica mediante un modelo que contempla dos señales diferentes. Por un lado, algunos péptidos de la gliadina que se generarían durante la digestión gastrointestinal, como el 19-mer, juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad celiaca al desencadenar una respuesta inmunológica innata (Jabri B. and Sollid LD., 2006, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*; 3(9):516-525) a través de mecanismos independientes de DQ2 que dan lugar a la producción de IL-15 en células epiteliales. El resultado es la interrupción de la barrera epitelial y la inducción de la apoptosis en los enterocitos. Por otro lado, otros péptidos inmunodominantes, como el 33-mer (Shan L., *et al.*, 2002, *Science*; 297(5590):2275-2279), transforman en glutamato algunos de sus residuos de glutamina (desaminación) por la acción de la transglutaminasa tisular (tTG) y pueden llegar a la lámina propia donde son presentados por células dendríticas a ciertos linfocitos T específicos restringidos a moléculas HLA-DQ2/DQ8. La inflamación que se produce a continuación se ajusta a un perfil de citoquinas tipo I, mediada por IFNγ, y la lesión se

caracteriza por una infiltración masiva de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia críptica y atrofia de las vellosidades.

Hoy en día, el único tratamiento para la enfermedad celiaca consiste en mantener de por vida una dieta libre de gluten, la cual suele conducir a la completa remisión de la enfermedad. Dicho tratamiento es bien tolerado por los pacientes celiacos y supone una clara mejora en su salud y calidad de vida. Sin embargo, mantener de manera rigurosa una dieta exenta de gluten resulta muy difícil debido, por ejemplo, a la presencia de trazas contaminantes en los alimentos sin gluten, su alto precio o la presión social a la que se ven sometidos estos pacientes, sobre todo los más jóvenes, para consumir gluten y que está ocasionada por las costumbres alimenticias imperantes en Occidente. Por todas estas razones, durante los últimos años se han investigado terapias alternativas a la dieta libre de gluten que tratan de combatir la enfermedad por distintas vías: disminuyendo la exposición al gluten (por ejemplo, mediante la degradación enzimática de las fracciones tóxicas de los cereales), inhibiendo la permeabilidad intestinal o modulando la respuesta inmunitaria (por ejemplo, mediante el desarrollo de vacunas basadas en péptidos del gluten, o la inhibición de la tTG).

La anulación de la actividad tóxica e inmunogénica del gluten mediante degradación enzimática presenta muchos atractivos como terapia oral alternativa. En este sentido, se ha probado la actividad detoxificadora de distintas enzimas como la prolil endopeptidasa o una endoproteasa específica de glutamina. Otra fuente enzimática para la hidrólisis del gluten son las bacterias probióticas. No obstante, es indudable que el éxito de este tipo de terapias está vinculado a una mejor y más completa caracterización de los péptidos que componen la fracción tóxica del gluten.

Otro aspecto de la enfermedad celíaca que está en desarrollo es el del diagnóstico. Actualmente, la única prueba admitida por la comunidad médica para diagnosticar definitivamente a un enfermo celiaco es el análisis histopatológico de biopsias de intestino delgado, las cuales deben mostrar las típicas anomalías morfológicas. No obstante, se han desarrollado diversas pruebas serológicas que, al ser menos agresivas que la biopsia, están indicadas como paso previo en el diagnóstico de la enfermedad. La prueba serológica más sensible y específica es la detección de autoanticuerpos tipo IgA contra el endomisio (EMA) o contra la tTG. El desarrollo de pruebas para detectar la presencia de anticuerpos contra péptidos tóxicos del gluten desaminados se ha demostrado también como herramienta muy útil en el diagnóstico de la enfermedad (Tack GJ., *et al.*, 2010, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*; 7:204-213).

Para avanzar en el desarrollo de un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celiaca es fundamental el estudio de su patogénesis, en la cual interaccionan de manera muy compleja factores de carácter ambiental, genético e inmunológico. Los determinantes ambientales fundamentales para el desarrollo de la enfermedad son de tipo alimenticio: el gluten del trigo y otras proteínas relacionadas inducen respuestas inmunitarias de tipo innato y adaptativo que provocan el daño en la mucosa del intestino delgado. El gluten comprende un conjunto de más de 100 proteínas de reserva que se encuentran en la semilla del trigo. Según su nivel de solubilidad, el gluten se divide en gliadinas y gluteninas, ambas implicadas en la enfermedad celiaca. Existen homólogos de estas proteínas en la cebada, el centeno y algunas variedades de avena, lo que explica que dichos cereales puedan también provocar la enfermedad. Se ha propuesto que hay péptidos procedentes del gluten, y proteínas relacionadas de la cebada, el centeno y la avena, que no son completamente digeridos por las enzimas gastrointestinales y pancreáticas, lo que provoca que, bajo ciertas condiciones, puedan

penetrar en la lámina propia del intestino delgado. Además, se ha especulado que ciertos factores estresantes, como infecciones de tipo vírico, pueden afectar a la permeabilidad intestinal favoreciendo la aparición de la enfermedad celiaca.

Los péptidos del gluten resistentes a la digestión son ricos en prolina y glutamina, puesto que la mayoría de las proteasas no cortan en residuos adyacentes a la prolina, y la glutamina no es un residuo preferente para ninguna de las endoproteasas del intestino. Por tanto, los péptidos con longitud suficiente como para desencadenar una respuesta inmunitaria son capaces de evadir la digestión gastrointestinal y llegar intactos al epitelio. Tal es el caso del péptido 33-mer de la α-gliadina de trigo, que es resistente a proteasas y que se ha considerado como el iniciador primario de la respuesta inflamatoria al gluten en los enfermos celiacos. Así, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que el péptido 33-mer es el péptido del gluten más bioactivo (inmunodominante) que es reconocido por células T procedentes de donantes celiacos HLA-DQ2^{+}, aunque no es el único péptido que muestra tal actividad.

La identificación de los péptidos del gluten desencadenantes de respuesta en las células T intestinales es crucial, entre otras cosas, para la búsqueda de terapias alternativas a la dieta exenta de gluten. La bibliografía recoge algunos péptidos del gluten con actividad inmunotóxica demostrada (Tye-Din J., *et al.*, 2010, *Science Translational Medicine*; 2(41):1-14; Camarca A., *et al.*, 2009, *The Journal of Immunology*; 189:4158-4166; Vader, *et al.*, 2002, *Gastroenterology*; 122:1729–1737), la mayoría de los cuales pertenecen a las familias α o γ–gliadinas, seguido por las gluteninas y con menor frecuencia a la ω-gliadina. Los péptidos tóxicos del gluten son de aplicación en métodos de diagnóstico y/o tratamiento de los individuos celiacos (WO03066079, EP0905518, US5817523, WO9727217, US20080318852, US20090156490 y US20060240475).

Otra aplicación derivada de la identificación de un péptido del gluten con actividad inmunotóxica consiste en la medición de la fracción tóxica del gluten en alimentos. Las técnicas más implantadas para el control del gluten en los alimentos son los ensayos ELISA, la técnica de PCR, *Western Blot,* espectrometría de masas, cromatografía y tiras inmunocromatográficas. Entre ellas, son las técnicas enzimáticas inmunoabsorbentes (ELISA), basadas en anticuerpos monoclonales frente a epitopos específicos, las que reúnen las características más deseables de sencillez, sensibilidad y economía. Más novedosas, y aún en desarrollo, son las técnicas que utilizan biosensores o tecnología de *lab-on-a-chip*.

Para la detección de gluten mediante ELISA se han desarrollado distintos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos del gluten. Se ha descrito que no solamente los péptidos de las gliadinas son tóxicos para los celiacos, sino que también lo son los de las gluteninas, razón por la cual es deseable que un método para detectar toxicidad por gluten en alimentos sea capaz de medir péptidos presentes en ambos tipos de proteínas. Los anticuerpos monoclonales R5 (Sorell L., *et al*., 1998, *FEBS Lett*; 439:46-50), G12 (Morón B., *et al*., 2008, *PLoS ONE*; 3:405-414), 401.21 (Skerritt J., *et al*., 1990, *J. Agric. Food Chem.*; 38:1771-1778) y PN3 (Bermudo Redondo, *et al*., 2005, *Analytica Chimica Acta*; 551:105-114) son específicos frente a distintas fracciones del gluten y, por tanto, se aplican a la detección del mismo en alimentos. Asimismo, en los documentos de patente WO2006004394, WO2006051145, ES2142720, GB2207921 y AU611921 se proponen procedimientos basados en ELISA para la detección de gluten en alimentos.

Finalmente, en cuanto a la metodología empleada para identificar los péptidos del gluten causantes de la inmunotoxicidad, éstos a menudo incluyen un paso de digestión *in vitro* con proteasas de una solución de gluten. Otras veces se han empleado algoritmos para predecir patrones

de deamidación del gluten por la tTG, o para generar los posibles epitopos reconocibles por las células T intestinales a partir de secuencias conocidas de prolaminas o gluteninas. Sin embargo, y pese a la idea existente de que los enfermos celiacos digieren el gluten de manera diferenciada a los individuos sanos, hasta ahora no se han destinado esfuerzos a la caracterización de los péptidos generados específicamente en el intestino de los pacientes celiacos como resultado de sus actividades proteolíticas, siendo éstos de especial interés para el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad celiaca en individuos, debido a que su aplicación en este sentido supondría una clara mejora, en términos de especificidad y eficacia, con respecto a los métodos existentes en la actualidad que se basan en otros péptidos inmunogénicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un péptido aislado de ocho aminoácidos, de ahora en adelante “péptido de la invención” o “péptido 8-mer”, que se genera de forma natural en el intestino de los pacientes celiacos por la acción de las proteasas bacterianas presentes en su flora intestinal que degradan la gliadina del gluten. Los inventores demuestran que este péptido presenta capacidad inmunogénica, siendo capaz de estimular células del sistema inmune en cultivo procedentes tanto de pacientes celiacos como de individuos no celiacos. Por ello, y debido a que el péptido de la invención se genera *in vivo* en el intestino de los enfermos celiacos y no así en el intestino de individuos sanos o que presentan otro tipo de patologías, dicho péptido es un marcador altamente específico para el diagnóstico y/o seguimiento de esta enfermedad, así como una interesante diana terapéutica para el desarrollo de compuestos o composiciones útiles para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de esta condición patológica. Además, gracias a su capacidad inmunogénica, el péptido de la invención también es de utilidad como agente terapéutico,

preferiblemente profiláctico, complementario o alternativo a la dieta sin gluten, en individuos que sufren esta enfermedad.

Por otro lado, los anticuerpos frente a este péptido de la invención son de utilidad para la detección y/o cuantificación de este último preferiblemente en alimentos, lo que permite conocer la toxicidad por gluten en los mismos.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado de secuencia SEQ ID NO: 1, “péptido de la invención” o “péptido 8-mer”. Como se ha mencionado, este péptido presenta actividad inmunogénica y es producto de la proteólisis que específicamente sufre la gliadina del gluten en el intestino de los pacientes celiacos aunque, como muestran los ejemplos de la presente invención, dicho péptido forma parte no solo de las secuencias de las gliadinas sino también de las secuencias de otras proteínas pertenecientes a otras especies de cereales tóxicos para celiacos, como las gluteninas, secalinas y hordeínas.

Este péptido de la invención puede presentar variantes, las cuales se refieren a variaciones limitadas en su secuencia aminoacídica que permiten el mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia, SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones son por aminoácidos conservados. Los aminoácidos conservados son aminoácidos que tienen cadenas laterales y propiedades similares en cuanto a, por ejemplo, hidrofobicidad o aromaticidad. Estas sustituciones incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre lisina (Lys) y arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y/o entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina

(Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del péptido. Por ello, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homóloga a las secuencias descritas en la presente invención.

El péptido de la invención puede presentar modificaciones derivadas de su procesamiento enzimático. Así, debido a que los péptidos inmunogénicos del gluten pueden sufrir en el intestino de los individuos celiacos una desaminación (sustitución de glutamina por glutamato) por acción de la transglutaminasa tisular (tTG), las posiciones 4, 6 y/o 7 de la SEQ ID NO: 1, que en la forma nativa del péptido son glutaminas (Gln), pueden estar sustituidas por glutamato (Glu). Por ello, en una realización preferida la secuencia del péptido de la invención es SEQ ID NO: 2, péptido (nativo) que ha sido aislado en los ejemplos de la presente invención a partir de proteínas de varias especies de cereales tóxicos para celiacos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, cebada, centeno y trigo. La SEQ ID NO: 2 corresponde a la SEQ ID NO: 1 donde las posiciones 4, 6 y 7 son Gln. En otra realización preferida el péptido de la invención se encuentra desaminado, más preferiblemente como resultado de su procesamiento por la tTG, aun más preferiblemente, la secuencia del péptido de la invención es SEQ ID NO: 3, secuencia que corresponde a la SEQ ID NO: 1 donde las posiciones 4 y 7 son Gln y la posición 6 es Glu.

El péptido de la presente invención y sus variantes o derivados pueden ser sintetizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante síntesis química, técnicas de ADN recombinante, aislamiento de fuentes naturales o por proteólisis *in vitro*. El péptido de la invención puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de

fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal, u otro polipéptido que tenga un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido.

El diagnóstico *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo puede llevarse a cabo empleando el péptido de la invención mediante diversos métodos. Uno de estos métodos podría ser, aunque sin limitarnos, la detección de la actividad proteolítica intestinal que da lugar a la liberación de dicho péptido a partir de gliadina, o de otras proteínas relacionadas como las secalinas, hordeínas o gluteninas, lo cual podría realizarse, por ejemplo, utilizando el péptido de la invención modificado con al menos un sustrato cromogénico, fluorigénico o luminiscente de manera que, al ponerlo en contacto con una muestra biológica aislada de intestino, se genera color únicamente en el caso de los enfermos celiacos debido a la presencia de enzimas específicos asociados a su flora intestinal capaces de llevar a cabo la liberación del péptido por hidrólisis proteolítica. Por ello, en una realización más preferida, el péptido de la invención además presenta un compuesto químico unido a su extremo N- y/o C-terminal. Preferiblemente, este compuesto químico es biotina, molécula con afinidad por la estreptavidina. Dicho compuesto químico se puede añadir, por ejemplo, sintéticamente al péptido de la invención mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica. En otra realización preferida, el compuesto químico es un compuesto cromogénico, fluorigénico o luminiscente. Un “compuesto cromogénico” es aquel que produce color o pigmento. En la presente invención el compuesto cromogénico es, preferiblemente, la p-nitroanilida. Un “compuesto fluorigénico” es aquel que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, derivados 4-metilumbeliferilos u o- ó p-halometil fenoles. Un “compuesto luminiscente” es aquel que emite fotones en lugar de dar color visible, por tanto, es un

compuesto que emite luz regresando desde un estado electrónicamente excitado a su estado original. Dentro de este último término se incluye la bioluminiscencia, fotoluminiscencia y quimioluminiscencia. Un ejemplo de compuesto luminiscente es, aunque sin limitarnos, la luciferina-luciferasa.

En una realización aun más preferida, el péptido de la invención además presenta otro péptido unido a su extremo N- y/o C-terminal. La unión de un péptido a otro puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas de obtención de proteínas de fusión.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada que codifica para el péptido de la invención, de ahora en adelante "secuencia nucleotídica de la invención". Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica.

Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. La secuencia nucleotídica de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencionales, o bien mediante secuenciación. Dicha secuencia nucleotídica, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarnos, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' y/o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad

del péptido generado a partir de ellos o para permitir una mejor purificación del mismo.

El péptido de la invención presenta capacidad antigénica y por tanto puede utilizarse para desarrollar anticuerpos mono o policlonales que se unan específicamente a él, lo cual puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo frente al péptido de la invención, de ahora en adelante “anticuerpo de la invención”.

Uno de los métodos que podría llevarse a cabo para obtener el anticuerpo de la invención consiste, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la inmunización de animales con el péptido de la invención y la posterior purificación, por ejemplo a partir del suero, de los anticuerpos específicos generados frente al mismo.

El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, a moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el péptido de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab’)2, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina o mediante técnicas de ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular del

antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

El anticuerpo de la invención presenta especificidad frente al péptido de la invención, por lo que es de utilidad en varias aplicaciones, a saber: para la detección y/o cuantificación del péptido de la invención, preferiblemente en alimentos formando parte de la proteína de la que procede, de manera que sea posible detectar toxicidad por gluten en los mismos; para la detección y/o cuantificación del péptido de la invención en una muestra biológica aislada de un individuo, con el objetivo de realizar el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca; o bien para bloquear el péptido de la invención, inhibiendo parcial o totalmente su actividad inmunogénica, en un método de tratamiento de dicha enfermedad.

Para llevar a cabo esta última aplicación en individuos humanos interesa que el anticuerpo de la invención sea un anticuerpo humanizado, ya que de este modo no se genera una respuesta anafiláctica por parte del sistema inmunitario cuando se administra el anticuerpo humanizado de la invención a un humano. Usando la tecnología del ADN recombinante es posible construir un anticuerpo monoclonal humanizado uniendo una región variable o de reconocimiento antigénico del anticuerpo de la invención a un armazón de un anticuerpo humano. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de las regiones hipervariables del receptor se han sustituido por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

El término “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable”. Los residuos de sostén (en inglés “framework”) o “FR” son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable. En algunos casos, los residuos de sostén (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más la función del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o prácticamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, por lo menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), en general de una inmunoglobulina humana. Distintos procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados son conocidos en el estado de la técnica.

Por tanto, en una realización preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente humanizado, y puede ser recombinante, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante para el anticuerpo de la invención o para el péptido de la invención, o que produce el anticuerpo de la invención o el péptido de la invención como resultado de la recombinación homóloga.

Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular “in vitro” así como una célula en un animal hospedador.

El anticuerpo de la invención puede ser quimérico. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula que expresa el anticuerpo de la invención, de ahora en adelante “célula de la invención”. La célula de la invención es, preferiblemente, un linfocito B o un hibridoma, entendiéndose por “hibridoma” la línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo de la invención con una línea celular de mieloma (linfocito B canceroso) que no produce una inmunoglobulina propia; así, se trata de una línea celular inmortal capaz de producir el anticuerpo monoclonal de la invención, el cual puede recuperarse del medio.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende el péptido, la secuencia nucleotídica, el anticuerpo o la célula de la invención.

La composición de la invención puede comprender además adyuvantes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el

sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. El "vehículo farmacéuticamente aceptable", al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. El término "adyuvante" se refiere a un agente que no posea un efecto antigénico por sí mismo, pero que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la composición de la invención. Existen multitud de adyuvantes conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, agonistas de los receptores tipo toll, citoquinas, escualeno, adyuvante incompleto de Freund o adyuvante completo de Freund. Por tanto, el término "composición" incluye también una "composición farmacéutica" y dentro de ella lo que se conoce como "vacuna".

Preferiblemente, la composición de la invención comprende el péptido, la secuencia nucleotídica, el anticuerpo o la célula de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" la cantidad de péptido, secuencia nucleotídica, anticuerpo o célula de la invención, que produzca el efecto deseado. La

dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede ser formulada en forma de liposomas o nanosferas, de formulaciones de liberación sostenida o de cualquier otro sistema convencional de liberación.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

Como se ha mencionado anteriormente, el péptido inmunogénico de la invención se genera de forma natural en el intestino de los pacientes celiacos por la acción de las proteasas bacterianas presentes en su flora intestinal que degradan la gliadina del gluten, o la secalina, hordeína o glutenina, por lo que su uso como diana terapéutica es interesante para la identificación de compuestos o composiciones que sirvan para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido o de la

secuencia nucleotídica de la invención para la identificación o diseño de compuestos o composiciones para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

En un método de identificación o diseño de los compuestos o composiciones mencionados en el párrafo anterior mediante el uso del péptido o de la secuencia nucleotídica de la invención, dichos compuestos o composiciones se podrían clasificar como útiles para el diagnóstico de la enfermedad celiaca cuando son capaces de unirse específica y selectivamente al péptido de la invención, independientemente de si interfieren o no con su actividad biológica o de si alteran o no su estructura. De igual modo, en dicho método estos compuestos o composiciones se podrían clasificar como útiles para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad celiaca cuando son capaces de alterar la actividad biológica del péptido de la invención, reduciendo o inhibiendo por completo su toxicidad o capacidad inmunogénica.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del anticuerpo o de la célula de la invención para la detección y/o cuantificación del péptido de la invención. Esta aplicación del anticuerpo y de la célula de la invención es de utilidad, no solo para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo, sino también para determinar la presencia y/o cantidad de gluten en los alimentos, permitiendo así seleccionar aquellos alimentos aptos para el consumo por pacientes de enfermedad celiaca. Por ello, en una realización preferida, la detección y/o cuantificación del péptido de la invención se realiza en alimentos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, cereales.

La ventaja de detectar este péptido de la invención frente a otros péptidos del gluten que han sido identificados también como inmunogénicos radica en que, como se muestra en los ejemplos de la presente invención, el péptido de la invención está distribuido ampliamente en varios géneros de

cereales tóxicos, incluyendo, aunque sin limitarnos, cebada, centeno y trigo (tanto silvestre como cultivado), y además está presente no solo en prolaminas (gliadinas, hordeínas y secalinas) sino también en una glutenina de bajo peso molecular. Dicha detección y/o cuantificación se puede llevar a cabo mediante ensayos inmunológicos, por ejemplo, aunque sin limitarnos, por *Western blot*, inmunoprecipitación, *arrays* de proteína, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA directo, indirecto, en sándwich o competitivo, para determinar la presencia y/o cantidad de péptido aislado en muestras biológicas aisladas de individuos (diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca), o formando parte de la proteína de la que procede en extractos de alimentos.

Un método preferido de detección y cuantificación del péptido de la invención mediante el anticuerpo o la célula de la invención es un enzimoinmunoensayo tipo sándwich, por ejemplo, basado en el empleo de una pareja de anticuerpos de la invención, específicos frente al péptido de la invención con afinidad por dos epítopos del mismo que se encuentren lo suficientemente separados como para permitir la interacción estérica de las dos moléculas de anticuerpos simultáneamente con el péptido; uno de los anticuerpos se fija a un soporte sólido, por ejemplo, aunque sin limitarnos, a una placa de plástico o a una membrana de PDVF, y el segundo anticuerpo se utiliza como marcador conjugado con un enzima que cataliza una reacción colorimétrica (o con un fluorocromo en técnicas fluorométricas); así la muestra a estudiar se incuba con estos reactivos y se mide la intensidad de color o la fluorescencia al final del proceso, siendo ésta directamente proporcional a la cantidad de péptido de la invención presente en la muestra. Otro método preferido de detección y cuantificación del péptido de la invención es un enzimoinmunoensayo tipo competitivo similar al anterior pero donde el anticuerpo marcador se sustituye por el péptido de la invención sintético conjugado con un enzima o fluorocromo, a continuación se incuba con la

muestra a analizar y, en este caso la cantidad de péptido en la misma será inversamente proporcional al color desarrollado o a la fluorescencia emitida. Otro método preferido de detección del péptido de la invención consiste en llevar a cabo una técnica inmunocromatográfica siguiendo un proceso similar al primer método descrito en este párrafo, pero adsorbiendo uno de los anticuerpos de la pareja en el PDVF y utilizando como sustancia de detección el segundo anticuerpo de la pareja con el marcador correspondiente. Esta última técnica permite hacer determinaciones cualitativas rápidas.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “muestra biológica aislada” se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica puede ser un tejido o un fluido biológico, preferiblemente es una muestra de suero, de heces o de aspirado intestinal, más preferiblemente de fluido duodenal-yeyunal. La muestra puede ser tomada de mamíferos no humanos, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o cánidos, o más preferiblemente de un humano.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido, del anticuerpo o de la célula de la invención para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo. En este sentido, otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo que comprende:

a. detectar y/o cuantificar en una muestra biológica aislada, preferiblemente en una muestra de heces o de aspirado intestinal, más preferiblemente en una muestra de fluido duodenal-yeyunal, el péptido de la invención (la presencia del péptido de la invención en dicha muestra es indicativo de un fenotipo celiaco); lo cual podría llevarse a cabo, por ejemplo aunque sin limitarnos, utilizando el anticuerpo o la célula de la invención en los métodos descritos

anteriormente en esta memoria para la detección y/o cuantificación del péptido de la invención, o bien mediante geles de electroforesis, RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen o mediante técnicas cromatográficas o de espectroscopía de masas; o

b. detectar y/o cuantificar en una muestra biológica aislada, preferiblemente en una muestra de suero, actividades inmunológicas generadas frente al péptido de la invención por parte del sistema inmune humoral (detección y/o cuantificación de anticuerpos frente al péptido de la invención) o celular (detección y/o cuantificación de linfocitos T específicos frente al péptido de la invención); lo cual podría llevarse a cabo utilizando el péptido de la invención, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en los métodos que se describen a continuación.

En la enfermedad celiaca los anticuerpos específicos frente al péptido de la invención se centran en los isotipos IgG e IgA por separado, o ambos IgG+IgA. En este caso, los anticuerpos frente al péptido de la invención constituyen una variante de los anticuerpos antigliadina y aportan la especificidad que les falta a estos marcadores. Los anticuerpos antigliadina (AAG) tienen la importancia histórica de ser la primera herramienta serológica útil en el diagnóstico de la enfermedad celiaca. La aparición de anticuerpos contra elementos de la dieta en la enfermedad celiaca es conocida desde los años sesenta del pasado siglo. Los AAG se dirigen contra determinantes antigénicos de la α-gliadina muy conservados y compartidos con las otras fracciones (gliadinas β, γ y ω). Sin embargo, estos anticuerpos no son específicos de la enfermedad celiaca pudiendo encontrarse en otras patologías e incluso en individuos sanos. Por el contrario, los anticuerpos frente al péptido de la invención son aquellos anticuerpos antigliadina, antisecalina, antihordeína y antiglutenina con afinidad por fragmentos de gliadina, secalina, hordeína y glutenina específicamente procesadas en el intestino de pacientes

celiacos. Por tanto, la detección y/o cuantificación de estos anticuerpos en una muestra biológica aislada constituye un eficaz método de diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca. La detección y/o cuantificación de estos anticuerpos frente al péptido de la invención, preferiblemente frente a sus variantes desaminadas por la tTG, se puede llevar a cabo utilizando el péptido de la invención en distintas técnicas inmunológicas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos:

- Técnicas inmunocromatográficas, en las que se adsorbe el péptido de la invención a tiras de membrana de nitrocelulosa, PVDF o materiales similares y, mediante un flujo lateral, la muestra biológica a analizar se pone en contacto con dicho péptido adsorbido, fijándose contra el mismo los anticuerpos específicos que pudieran existir en ella y arrastrándose el resto. Estos anticuerpos pueden visualizarse mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la reacción con anticuerpos antiinmunoglobulinas (anti-IgA o anti-IgG) o mediante cualquier otra sustancia capaz de fijarse específicamente a las inmunoglobulinas (por ejemplo, proteína A o proteína G), que preferiblemente a su vez estaría conjugada con un marcador coloreado o capaz de generar color, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, con oro coloidal. Los reactivos se encontrarían fijados en distintas capas de la tira y serían movilizados por el propio flujo de la muestra, por lo que preferiblemente este método se realiza en un solo paso. Esta técnica es cualitativa, con la ventaja de la rapidez y la no necesidad de instrumentación para su evaluación.

- Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). En este caso, la adsorción del péptido de la invención se realiza sobre un plástico, preferiblemente en forma de placa multipocillo, sobre el que se desarrolla la reacción de forma similar a la descrita en el párrafo anterior, aunque por tratarse de una técnica de tipo semicuantitativo se emplean preferiblemente los anticuerpos anti-Ig conjugados con enzimas. Las enzimas catalizan una reacción colorimétrica al serles añadido un sustrato químico que cambia de color al ser modificado por la enzima. La cantidad de color generado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos que

se encuentran en la muestra biológica. Una variante serían las técnicas competitivas que evalúan la capacidad de la muestra biológica de inhibir la unión de una cantidad conocida del péptido de la invención marcado a anticuerpos frente al péptido de la invención fijados a la superficie sólida.

- Técnicas inmunofluorométricas. En esencia similares a la técnica ELISA, pero utilizando una sustancia fluorescente como marcador para el anticuerpo secundario. En los casos en que se utilizan variantes de polarización no es necesario fijar el antígeno a la superficie sólida. En este tipo de técnica también se usan variantes competitivas. El marcaje con fluorocromos aumenta la sensibilidad de la técnica frente al enzimoinmunoanálisis. Se pueden así mismo usar microesferas de poliestireno como soporte para realizar la reacción antígeno-anticuerpo y realizar las lecturas mediante un citómetro de flujo, lo que permitiría además un ensayo multiplex si existen distintas microesferas según el antígeno, detectando la presencia de otros antígenos además del péptido de la invención.

Alternativamente, para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca se podría detectar y/o cuantificar en la muestra biológica aislada la presencia de linfocitos T específicos frente al péptido de la invención mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, ensayos biológicos basados en células mononucleares procedentes del individuo, y preferiblemente obtenidas de sangre periférica o aisladas de la mucosa intestinal, y estimuladas *in vitro* con el péptido de la invención. La respuesta podría cuantificarse mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, ensayos de proliferación, blastogénesis, producción de sustancias solubles o expresión de marcadores de membrana celular, y se podrían comparar los resultados obtenidos en la muestra biológica analizada con controles positivos, por ejemplo, utilizando estímulos de mitógenos T, como la fitohemaglutinina, y controles negativos, como por ejemplo utilizando cultivos basales sin estímulo o con un estímulo inocuo. Este método de diagnóstico y/o seguimiento de la enfermedad celiaca

podría sustituir a las pruebas de provocación *in vivo* con gluten ya que, al consistir en una estimulación *ex vivo* de linfocitos aislados de la muestra biológica, aportaría la ventaja de no exponer al individuo a una sustancia potencialmente nociva para su organismo a la hora de realizar la confirmación del diagnóstico y/o seguimiento, y por otra parte este método sería más específico al determinar una sensibilización frente a una sustancia que se genera específicamente en el intestino de pacientes celiacos y no en otras patologías.

La presencia de una respuesta inmune, humoral o celular, frente al péptido de la invención se relaciona con que los péptidos de gliadina, secalina, hordeína o glutenina han pasado la barrera epitelial de la mucosa intestinal y han sido capaces de generar una respuesta adaptativa del sistema inmune del paciente (memoria inmunológica), o bien con la presencia del péptido de la invención en el organismo del individuo del cual procede la muestra analizada, lo que es indicativo de un fenotipo intestinal celiaco en el que se incluiría la actividad de una flora intestinal específica de los pacientes celiacos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo que comprende:

a. detectar en una muestra biológica aislada, preferiblemente de intestino, la actividad proteolítica que da lugar a la formación del péptido de la invención a partir de gliadina, secalina, hordeína o glutenina. La presencia de dicha actividad proteolítica en la muestra analizada es indicativo de un fenotipo celiaco.

Para ello podría utilizarse, por ejemplo aunque sin limitarnos, el péptido de la invención modificado con al menos un sustrato cromogénico, fluorigénico o luminiscente. La incubación de dicho péptido modificado junto con la muestra biológica aislada, preferiblemente procedente de intestino, produce color únicamente en el caso de los individuos celiacos,

debido a la presencia de enzimas específicos asociados a su flora intestinal capaces de liberar por digestión enzimática el péptido de la invención.

El término “diagnóstico” se refiere a determinar la ausencia o presencia de enfermedad celiaca en un individuo. El término “seguimiento” se refiere a analizar el curso o progreso de la enfermedad celiaca en un individuo, preferiblemente cuando dicho individuo ha sido previamente diagnosticado para dicha enfermedad, más preferiblemente cuando dicho individuo está sometido a un tratamiento terapéutico, y aun más preferiblemente cuando dicho individuo está sometido a una dieta libre de gluten.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de compuestos probióticos que modifiquen la flora bacteriana intestinal responsable de la actividad proteasa que hidroliza la gliadina, secalina, hordeína o glutenina generando el péptido de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad celiaca. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de antibióticos que inhiban, parcial o totalmente, la proliferación de la flora bacteriana intestinal responsable de dicha actividad proteasa, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad celiaca.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido, de la secuencia nucleotídica, del anticuerpo, de la célula o de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, al péptido, la secuencia nucleotídica, el anticuerpo, la célula o la composición de la invención para su uso como medicamento, de ahora en adelante “medicamento de la invención”.

El “medicamento” al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida, el medicamento de la invención es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de la enfermedad celiaca; y puede utilizarse como tratamiento alternativo o complementario a la dieta sin gluten que normalmente siguen los individuos que padecen esta enfermedad.

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad celiaca en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología; o

(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

El péptido de la invención puede utilizarse, por ejemplo aunque sin limitarnos, en un método profiláctico con el fin de realizar una manipulación inmunológica del individuo, preferiblemente de un individuo celiaco, tratando así de (re)instaurar la tolerancia frente al gluten. Por ello, en una realización más preferida el medicamento de la invención es una vacuna, aun más preferiblemente cuando dicho medicamento comprende el péptido o la secuencia nucleotídica de la invención.

El término “vacuna” se refiere a una preparación epitópica o antigénica empleada para provocar una respuesta del sistema inmunológico frente a uno o varios antígenos. Son preparados de antígenos o epítopos que, una vez dentro del organismo, provocan la respuesta del sistema inmunitario mediante la producción de anticuerpos y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria. La vacuna de la invención puede administrarse al individuo una sola vez o en repetidas ocasiones (administración inicial y subsecuentes), dependiendo de la capacidad del individuo para producir una respuesta inmunológica en respuesta a la administración de la vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “primer kit de la invención”, que comprende el péptido de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “segundo kit de la invención”, que comprende el anticuerpo o la célula de la invención.

El primer y segundo kit de la invención pueden comprender además, sin ningún tipo de limitación, anticuerpos primarios conjugados o no conjugados, péptidos, tampones, anticuerpos secundarios conjugados, estreptavidina conjugada, proteínas o péptidos patrones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc. Por otro lado, el primer y segundo kit de la invención pueden incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El primer y segundo kit de la invención pueden contener además otras proteínas o péptidos que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, estos kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo, o para detectar y/o cuantificar el péptido de la invención, preferiblemente en alimentos.

Opcionalmente, el péptido, el anticuerpo o la célula de la invención están marcados o inmovilizados en los kits de la invención. Preferiblemente, éstos están marcados con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima o un substrato de una enzima. Más preferiblemente, el péptido, el anticuerpo o la célula de la invención están inmovilizados en los kits de la invención. El término “inmovilizado”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que el péptido, el anticuerpo o la célula de la invención pueden estar unidos a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, (por

ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico similar, o bien cuentas (esferas, por ejemplo, esferas de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del segundo kit de la invención para la detección y/o cuantificación del péptido de la invención. En una realización preferida, la detección y/o cuantificación del péptido se realiza en alimentos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del primer o segundo kit de la invención para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra la identificación de tres péptidos de gliadina mediante zimogramas independientes con gliadina de dos pacientes celiacos no tratados.

Fig. 2. (a) Muestra los histogramas representativos de la citometría de flujo realizada a células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos a partir de muestras de sangre periférica, **compatibles con ABO, de donantes sanos, estimuladas** durante 48 horas con

lipopolisacárido (LPS, 1mg/ml), o con los péptidos del gluten 8-mer (SEQ ID NO: 2, 100 µg/ml), 19-mer (SEQ ID NO: 4, 100 µg/ml) y 33-mer (SEQ ID NO: 5, 100 µg/ml), y después de las condiciones basales (control interno). Los histogramas sombreados representan la expresión de los marcadores co-estimuladores (CD40, CD80, CD86) o de activación (CD83) en las células dendríticas. Los histogramas vacíos representan los controles del isotipo. Este experimento es representativo de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se realiza por triplicado. (b) Se muestra el índice medio de fluorescencia (MFI) de un experimento simple realizado por triplicado, representativo de tres experimentos independientes con resultados similares.

Fig. 3. Muestra la expresión de RNA, en unidades arbitrarias (AU) de IFNγ, IL-4, IL-12p40, TNFα, IL-10, IL-23p19, IL-6, TGFβ e IL-17 en células dendríticas derivadas de monocitos obtenidos a partir de muestras de sangre periférica, compatibles con ABO, de donantes sanos, estimuladas durante 48 horas con lipopolisacárido (LPS, 1mg/ml), o con los péptidos del gluten 8-mer (SEQ ID NO: 2, 100 µg/ml), 19-mer (SEQ ID NO: 4, 100 µg/ml) y 33-mer (SEQ ID NO: 5, 100 µg/ml), y después de las condiciones basales (control interno). Se muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Fig. 4. Muestra el índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica, enriquecidas en células T, tras ser cultivadas con células dendríticas de pacientes control (C) o de pacientes celiacos sin tratar (uCD), previamente estimuladas con los péptidos del gluten 8-mer (SEQ ID NO: 2, 100 µg/ml, 10 µg/ml y 1 µg/ml), 19-mer (SEQ ID NO: 4, 100 µg/ml) y 33-mer (SEQ ID NO: 5, 100 µg/ml) referido a la proliferación basal inducida por células dendríticas cultivadas en medio sin estímulo y co-cultivadas con células mononucleares de sangre periférica enriquecidas en células T autólogas. Se muestran la media y la desviación estándar de un experimento realizado por triplicado, y que es

representativo de tres experimentos independientes con resultados similares. Cada experimento se realizó con un paciente celiaco sin tratar de genotipo HLA-DQ2^{+} y en paralelo con un individuo sano no celiaco HLA-DQ2^{-} como control (C).

Fig. 5. Muestra los niveles de anticuerpos IgA anti-péptido 8-mer (a) anti-péptido 8-mer desaminado (SEQ ID NO: 6) y (b) anti-péptido 8-mer nativo/sin modificar (SEQ ID NO: 7), ambos marcados con biotina, en muestras de suero de pacientes celiacos y controles no-celiacos.

Fig. 6. Muestra los niveles de anticuerpos IgA anti-péptido 8-mer desaminado en muestras de suero de pacientes celíacos (EC) en actividad, de pacientes celiacos en dieta sin gluten (EC DSG), controles no-celiacos, familiares sanos de pacientes celiacos HLA-DQ2+, familiares sanos HLA-DQ2-, y pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (colitis ulcerosa o Crohn). Los asteriscos indican valores estadísticamente significativos: (*) p<0,05; (**) p<0,005; (***) p<0,0005.

Fig. 7. Muestra los niveles de anticuerpos IgA anti-péptido 8-mer desaminado en muestras de suero de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) de acuerdo a la expresión de HLA-DQ2 (HLA-DQ2+, HLA-DQ2-, y HLA-DQ2- pero positivo para una de sus cadenas, DQA o DQB).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del péptido de la invención en el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para

ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Identificación del péptido inmunogénico 8-mer en cereales tóxicos para individuos celiacos.

En el presente ejemplo se puede ver cómo se aisló y determinó la actividad inmunogénica del péptido 8-mer de gliadina, y cómo la secuencia del péptido 8-mer puede encontrarse en proteínas del gluten de cereales inmunotóxicos. Dados los precedentes de un patrón exclusivo de metaloproteasas bacterianas capaces de degradar la gliadina en la mucosa duodenal de pacientes celiacos, actividad que era indetectable en individuos sanos (Bernardo *et al.*, 2009, *Gut.*; 58:886-887), se emprendió la identificación de los productos de dicha degradación. En primer lugar, se abordó el análisis por espectrometría de masas de trampa iónica de muestras tripsinizadas procedentes de las bandas de degradación de 26 kDa y 82 kDa extraídas del zimograma realizado con muestras biopsiadas de pacientes celiacos no tratados (Fig. 1). Mediante este método se identificaron tres péptidos, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, cuya secuencia se lanzó contra una base de datos no redundante de proteínas y, utilizando la herramienta Blastp del NCBI, se encontró que estos tres péptidos estaban presentes en especies de trigo (silvestres y cultivados), cebada o centeno, y dentro de estas especies, únicamente en familias de prolaminas (como gliadinas, hordeínas y secalinas) y gluteninas. Puesto que la gliadina utilizada en los zimogramas procedía de trigo, se consideraron las secuencias de prolaminas presentes en especies de trigo y se encontró que solamente uno de los péptidos (denominado 8-mer, de secuencia SEQ ID NO: 2) no era susceptible de haberse generado por tripsinización y, por lo tanto, su presencia se debía

exclusivamente a la acción de las proteasas provenientes del extracto duodenal del paciente enfermo. A continuación, en la Tabla 1 se relacionan las especies y grupos de proteínas que contienen el 8-mer íntegro, que se distribuye ampliamente en varias especies de cereales tóxicos para celiacos (cebada, centeno y trigo).

8-mer (SEQ ID NO: 2) 76 secuencias		
Grupo de proteínas (número de secuencias)	**Especies**	
	Nombre científico (número de secuencias)	**Nombre común**
omega gliadinas (25)	*Triticum aestivum* (6)	trigo común (trigo del pan)
	Triticum urartu (4)	trigo silvestre
	Triticum monococcum subsp. aegilopoides (2)	escaña silvestre
	Triticum monococcum (5)	trigo escaña
	Triticum turgidum subsp. paleocolchicum (1)	-
	Lophopyrum elongatum (3)	agropiro alto
	Triticum aestivum x Lophopyrum elongatum (3)	
	Aegilops tauschii (1)	*goatgrass* silvestre (antecesor del trigo)
omega secalinas (44)	*Triticum aestivum x Secale cereale* (3)	triticale octaploide
	Triticum turgidum subsp. durum x Secale cereale (4)	triticale hexaploide
	Secale cereale (8)	centeno
	Triticum aestivum (29)	trigo común (trigo del pan)
hordeínas (6)	*Hordeum vulgare*	cebada
	Hordeum vulgare subsp. vulgare	cebada
LMW glutenina (1)	*Triticum aestivum* (1)	trigo común (trigo del pan)

Tabla 1. Distribución del péptido SEQ ID NO: 2 en secuencias de cereales tóxicos para celiacos: cebada, centeno y varios trigos, estos últimos tanto silvestres como cultivados.

Como se verá más adelante, las pruebas que demuestran la actividad inmunoestimulante del nuevo péptido identificado, 8-mer, consistieron en: activación *in vitro* de células dendríticas (Fig. 2 y 3), y estimulación de células T autólogas mediada por células dendríticas (Fig. 4). Este péptido resultó ser inmunogénico en todos los individuos ensayados (pacientes celiacos y controles sanos no celiacos). El interés clínico radica en que dicho péptido inmunogénico únicamente se ha demostrado generar por la acción de las proteasas bacterianas aisladas del intestino de los enfermos celiacos. La búsqueda de una actividad proteásica similar en biopsias de duodeno de 11 individuos no celíacos fue infructuosa.

Más adelante se proporcionan los resultados que demuestran el efecto inmunogénico de este nuevo péptido del gluten, y se aportan ejemplos de realización en los que se empleó dicho péptido para probar *in vitro* su actividad inmunogénica a partir de sangre periférica de los controles (Fig. 2, 3 y 4). Las ventajas que aporta el péptido 8-mer sobre el resto de péptidos inmunotóxicos identificados en el gluten en cuanto a sus aplicaciones en el diagnóstico y la terapia de la enfermedad celiaca, radican precisamente en que se trata de un péptido natural, generado *in vivo* por la acción de proteasas bacterianas presentes en el intestino de los enfermos celiacos que, combinado con su predisposición genética, tiene un papel relevante en la patología celíaca.

EJEMPLO 2. Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad celiaca mediante la detección de anticuerpos anti 8-mer en suero.

En el presente ejemplo se ilustra el desarrollo de una forma de método ELISA que detecta la presencia de anticuerpos anti 8-mer en individuos sospechosos de padecer enfermedad celíaca. Para ello, se desarrolló un método de ELISA indirecto con el objetivo de detectar anticuerpos contra el péptido 8-mer de la gliadina en muestras de suero. Se utilizaron cuatro variantes del antígeno/péptido biotinilado (Biomedal S-L., Sevilla,

España), forma nativa FK-9-1 (SEQ ID NO: 7-BIOTINA, la SEQ ID NO: 7 corresponde a la SEQ ID NO: 2 con una lisina en su extremo C-terminal) y forma desaminada FK(BIO)-9-2 (SEQ ID NO: 6-BIOTINA, la SEQ ID NO: 6 corresponde a la SEQ ID NO: 3 con una lisina en su extremo C-terminal) por su posible modificación por la tTG, con biotinilación en el extremo N-terminal o C-terminal. Se fijaron sobre una placa con estreptavidina, a una concentración de 1µg/ml (en solución PBS+Tween 0,05%), con una preincubación óptima de 1 hora a temperatura ambiente. Tras añadir las muestras de suero a dilución 1:25, con incubación de 2 horas a 37º C, se utilizó un anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal de conejo anti-IgA/HRP humana de Dako) a una dilución 1:4000. Los sujetos de estudio de donde procedían las muestras incluían los siguientes grupos: pacientes celíacos en actividad (EC actividad), pacientes celiacos en dieta sin gluten (EC DSG), controles sanos, familiares sanos DQ2- y familiares sanos DQ2+.

Se comprobó así que el suero de los pacientes celiacos contenía anticuerpos frente al péptido 8-mer de gliadina. De las 4 variantes del péptido utilizado en la estandarización de la técnica de ELISA, sólo se obtuvieron resultados óptimos con los 2 péptidos biotinilados en el extremo carboxilo.

Los sueros de los pacientes celíacos en actividad presentaron niveles mayores de anticuerpos frente al péptido 8-mer de la gliadina que las muestras del grupo control, aunque solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso del péptido desaminado ($p<0,0001$) (Fig. 5).

En cuanto al péptido desaminado se observan diferencias significativas al comparar los niveles de anticuerpos del grupo de pacientes celiacos en actividad con los detectados en el grupo control ($p=0,0003$), y entre los

pacientes celiacos en dieta sin gluten (EC DSG) y los familiares sanos (p=0,0006) (Fig. 6).

EJEMPLO 3. Método de diagnóstico *in vitro* de la enfermedad celiaca, no detectada mediante otros métodos, en individuos con enfermedad inflamatoria intestinal mediante la detección de anticuerpos anti 8-mer en suero.

En este ejemplo se muestra cómo individuos con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que no habían sido diagnosticados anteriormente como celíacos por las pruebas serológicas convencionales (anticuerpos antitransglutaminasa tisular) o por endoscopia intestinal, pueden ser identificados como individuos celiacos cuando aparecen anticuerpos anti 8-mer de gliadina desaminada en suero.

En un grupo de 56 pacientes con EII que no dieron positivos en pruebas serológicas ni en biopsias intestinales para la detección de la enfermedad celiaca, se estudió el nivel en suero de anticuerpos que reconocieran el péptido 8-mer mediante el ensayo ELISA descrito en el Ejemplo 2. Se identificaron así 2 muestras de pacientes con colitis ulcerosa y 3 de pacientes con enfermedad de Crohn que presentaron niveles de anticuerpos anti-péptido 8-mer similares a los obtenidos para los pacientes celiacos (Fig. 6). En este grupo de pacientes con EII con valores elevados de anticuerpos anti 8-mer, se realizó un estudio de marcadores genéticos de la enfermedad celiaca (HLA-DQ2), cuyo resultado fue el de la siguiente tabla:

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	DQA	DQB
1	COLITIS ULCEROSA	-	+
2	COLITIS ULCEROSA	+	+
3	ENFERMEDAD DE CROHN	+	+
4	ENFERMEDAD DE CROHN	+	+
5	ENFERMEDAD DE CROHN	+	+

Tabla 2. Resultado del estudio de los marcadores genéticos de la enfermedad celiaca (HLA-DQ2) en pacientes de EII que presentaron valores elevados de anticuerpos anti 8-mer.

A continuación se realizó el mismo estudio de marcadores genéticos de enfermedad celiaca (DQ2) en el resto de los pacientes con EII en cuyas muestras se hizo la determinación de anticuerpos anti-péptido 8-mer. Los marcadores genéticos de los 56 pacientes diagnosticados con EII que se detectaron fueron los de la siguiente tabla:

Número de pacientes	DQA	DQB
13	+	+
20	-	-
11	+	-
12	-	+

Tabla 3. Resultado del estudio de los marcadores genéticos de la enfermedad celiaca (HLA-DQ2) en todos pacientes de EII en cuyas muestras se realizó la determinación de anticuerpos anti-péptido 8-mer.

En la Fig. 7 se muestran los niveles de anticuerpos anti 8-mer desaminado en pacientes de EII de acuerdo a la expresión de HLA-DQ2. Estos resultados demuestran que aquellos individuos con EII y con niveles elevados de anticuerpos anti-péptido 8-mer desaminado presentaban además marcadores genéticos de enfermedad celiaca (HLA-DQ2) positivos, lo que indica una alta probabilidad de que sean individuos celiacos. Por tanto, la detección de anticuerpos anti 8-mer, preferiblemente desaminado, permite identificar grupos de individuos celiacos que no son detectables por otras técnicas diagnósticas.

EJEMPLO 4. Actividad inmunogénica del péptido 8-mer en el sistema inmune celular.

El presente ejemplo muestra cómo puede utilizarse el péptido 8-mer para el diagnóstico de la enfermedad celiaca, mediante ensayos de estimulación en cultivo autólogo de células dendríticas y linfocitos T pertenecientes a pacientes celíacos HLA-DQ2+ y controles HLA-DQ2- no-celiacos.

Las células dendríticas derivadas de monocito actúan como células presentadoras de antígeno. Los experimentos de estimulación realizados en la presente invención incluyeron un control positivo de proliferación (linfocitos T cultivados en presencia de células dendríticas derivadas de monocitos previamente activadas en presencia de lipolisacárido, LPS) y dos controles negativos: fracción CD14- enriquecida en linfocitos T cultivados i) en medio basal y ii) en presencia de células dendríticas derivadas de monocitos sin estimular.

Para este ejemplo de realización se aislaron células mononucleadas de sangre periférica ABO-compatible mediante centrifugación en gradiente de densidad, y microesferas magnéticas con anticuerpos anti-CD14 para separar monocitos CD14+, que fueron inducidos durante 6 días a diferenciarse a células dendríticas inmaduras mediante IL-4 y GM-CSF (confirmado por citometría). Estas células se estimularon primero durante 48 horas con el péptido 8-mer (100 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml) y otros péptidos conocidos de gliadina 19- (100 μg/ml) y 33-mer (100 μg/ml), y después se hizo un co-cultivo con linfocitos T autólogos (población CD14- obtenida arriba), donde las células dendríticas actúan como células presentadoras de antígeno. Como controles negativo y positivo de estimulación, se utilizó un cultivo de células CD14- sin células dendríticas (basal), y de células CD14- estimuladas con lipopolisacárido (LPS), respectivamente. Tras 4 días, se calculó el índice de proliferación celular de acuerdo al ratio absorbancia de las células dendríticas estimuladas / absorbancia sin estimular en co-cultivo con linfocitos T autólogos.

La estimulación en cultivo de células dendríticas procedentes de muestras de controles sanos con el péptido 8-mer indujo la maduración fenotípica de estas células, que se manifestó por un aumento de la expresión en membrana de los marcadores CD40 y CD80, pero no de CD83 o CD86. Por el contrario, los péptidos 19- y 33-mer no modificaron la expresión de estas moléculas (Fig. 2a, 2b). La estimulación con péptidos de gliadina se asoció con la expresión de un perfil diferencial de mRNA de citocinas (Fig. 3), con aumento de la expresión de IFNγ (8-mer: x14,2 veces; 19-mer: x22,3 veces; 33-mer: x85,8 veces) y, en mucha menor medida, de TNFα (8-mer: x1,45 veces; 19-mer: x1,51 veces; 33-mer: x1,03 veces). Mayor diferencia se observó respecto a la IL-10, mientras que 19- y 33-mer redujeron su expresión (19-mer: x0,16 veces; 33-mer: x0,5 veces), el péptido 8-mer tuvo el efecto contrario (aumentó x2,3 veces), y algo similar ocurrió con la IL-4 que aumentó con 8-mer (x79 veces), moderadamente con 19-mer (x7,7 veces), y fue inhibida con 33-mer (x0,001 veces). Por el contrario, la expresión de IL-12p40 disminuyó ligeramente con 8- y 19-mer (x0,4 veces ambos), se inhibió con 33-mer, y en ningún caso se detectó IL-12p35 o IL-21. La estimulación con 8-mer podría seguir una vía de activación diferencial a través de un perfil Th17 de citocinas, como indica el aumento de IL-23p19 (8-mer: x45,3 veces; 19-mer: x2,7 veces; 33-mer: x6,2 veces), y de otras citocinas relacionadas como IL-6 (8-mer: x3,6 veces; 19-mer: x1,2 veces; 33-mer: x0,7 veces), y TGFβ (8-mer: x4,8 veces; 19-mer: x1,9 veces; 33-mer: x0,6 veces).

Tras la estimulación con el péptido 8-mer, las células dendríticas en co-cultivo indujeron una respuesta proliferativa de linfocitos T autólogos de una forma dependiente de dosis, tanto con células de pacientes celiacos HLA-DQ2+, como de individuos control HLA-DQ2- no-celiacos (100 μg/ml: índice de proliferación 2,09 ± 0,029 en celiacos, y 1,51 ± 0,108 en no-celiacos; 10 μg/ml: índice de proliferación 1,69 ± 0,005 en celiacos, y 1,28 ± 0,034 en no-celiacos; 1 μg/ml: índice de proliferación 1,27 ± 0,005 en celiacos, y 1,04 ± 0,039 en no-celiacos) (Fig. 4). En todos los casos

estudiados (3 pacientes celiacos DQ2+ y 3 individuos control DQ2- no-celiacos) se observó respuesta al péptido 8-mer, sin embargo, ésta fue más intensa en los celiacos, como indica el aumento de los índices de proliferación en todos los casos para la misma concentración de estímulo. Por el contrario, las células dendríticas estimuladas con los péptidos 19- y 33-mer no indujeron proliferación en los linfocitos T autólogos en ninguna de las muestras (19-mer: índice de proliferación 1,06 ± 0,011 en celiacos, y 1,03 ± 0,039 en no-celiacos; 33-mer: índice de proliferación 1,04 ± 0,005 en celiacos, y 1,04 ± 0,018 en no-celiacos) (Fig. 4).

EJEMPLO 5. Desarrollo de un anticuerpo monoclonal para detectar el péptido 8-mer.

En el presente ejemplo se muestra una estrategia para obtener anticuerpos monoclonales que reconozcan el péptido de gliadina 8-mer y que puedan usarse para, por ejemplo, determinar la presencia de gluten en alimentos.

Una secuencia codificante de 6 copias del péptido 8-mer en tándem se fusionó en un vector de expresión CASCADE, pALEX1a (Biomedal S.L., Sevilla, España), por el extremo 5' a una etiqueta de polihistidinas (6Xhistag) y por el extremo 3' al DNA codificante de una proteína coadyuvante como es un fragmento de proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma cruzi*. Usando una cepa de *E. coli* REG12 (Biomedal S.L.) se indujo la expresión de la proteína de fusión con salicilato y posteriormente ésta se purificó mediante cromatografía iónica por afinidad (IMAC) hasta obtener un grado de pureza superior al 95%.

Dos anticuerpos monoclonales contra el péptido de gliadina 8-mer se generaron de acuerdo con el método estándar, con algunas modificaciones específicas. En resumen, dos grupos de ratones Balb / c, obtenidos a partir de IFFA-CREDO (St Germain-sur l'Arbesle, Francia),

fueron inmunizados por vía subcutánea dos veces con una dosis de 0,025 mg de 8-mer-T-HSP70 o de la proteína purificada recombinante de 8mer-X2-HSP70 como inmunógeno. Dos semanas después de la última inmunización, una tercera dosis de la proteína de fusión se inoculó por vía intravenosa en los ratones de cada grupo. Todas las vacunas se llevaron a cabo sin adyuvante. Los títulos de los anticuerpos se evaluaron mediante un ELISA contra los péptidos 8-mer biotinilados descritos en el ejemplo 2, con el uso de unas placas tapizadas con estreptavidina en el día 4 después de la última inmunización. Los ratones inmunizados se sacrificaron, y los bazos se extirparon para su uso como fuente de células para la fusión con células de mieloma SP2. Solo las células del bazo de ratones inmunizados se fusionan con las células de mieloma previamente preparadas y cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino y 20% de aminopterina-timidina que contenía hipoxantina, porque el medio hipoxantina-aminopterina-timidina sólo permite que las células fusionadas sobrevivan en el cultivo. Las células fusionadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos con medio suplementado con aminopterina y que contenía las células alimentadas derivadas de los lavados salinos peritoneales del ratón.

Los anticuerpos producidos por los hibridomas seleccionados se analizaron para su capacidad para reaccionar con epítopos del gluten de trigo, cebada y centeno, por un lado, y de maíz y arroz por otro mediante ensayo ELISA en el que el gluten de cada especie tapizaba los pocillos. Se seleccionaron los hibridomas que produjeron anticuerpos que dieron reactividad de forma más sensible con el gluten de trigo, cebada y centeno, y no dieron ninguna con el de arroz o maíz.

Con dichos anticuerpos se pueden desarrollar ensayos ELISAs directo, de bloqueo o competitivo para detectar el péptido de la invención, por ejemplo, en muestras alimenticias. El ensayo ELISA directo se puede efectuar extrayendo los péptidos del gluten de la muestra alimenticia,

inmovilizándolos en las placas y luego usando uno de los anticuerpos desarrollados en la presente invención para que reaccione con los péptidos 8-mer de la muestra inmovilizada. El revelado se puede efectuar, por ejemplo, por conjugación previa del anticuerpo a un enzima tipo peroxidasa, cuya actividad puede estudiarse midiendo la cantidad de compuesto coloreado que se va acumulando tras añadirle el correspondiente reactivo cromogénico.

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado de secuencia SEQ ID NO: 1.

2. Péptido según la reivindicación 1 donde la secuencia es SEQ ID NO: 2.

3. Péptido según la reivindicación 1 donde la secuencia es SEQ ID NO: 3.

4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además presenta un compuesto químico unido a su extremo N- y/o C- terminal.

5. Péptido según la reivindicación 4 donde el compuesto químico es un compuesto cromogénico, fluorigénico o luminiscente.

6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además presenta otro péptido unido a su extremo N- y/o C-terminal.

7. Secuencia nucleotídica aislada que codifica para el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Anticuerpo frente al péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

9. Célula que expresa el anticuerpo según la reivindicación 8.

10. Composición que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la secuencia nucleotídica según la reivindicación 7, el anticuerpo según la reivindicación 8 o la célula según la reivindicación 9.

11. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de la secuencia nucleotídica según la reivindicación 7 para la identificación o diseño de compuestos o composiciones para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

12. Uso del anticuerpo según la reivindicación 8 o de la célula según la reivindicación 9 para la detección y/o cuantificación del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

13. Uso del anticuerpo o de la célula según la reivindicación 12 donde la detección y/o cuantificación del péptido se realiza en alimentos.

14. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, del anticuerpo según la reivindicación 8 o de la célula según la reivindicación 9 para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo.

15. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de la secuencia nucleotídica según la reivindicación 7, del anticuerpo según la reivindicación 8, de la célula según la reivindicación 9 o de la composición según la reivindicación 10, para la elaboración de un medicamento.

16. Uso del péptido, de la secuencia nucleotídica, del anticuerpo, de la célula o de la composición según la reivindicación 15, donde el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

17. Uso del péptido, de la secuencia nucleotídica, del anticuerpo, de la célula o de la composición según la reivindicación 16, donde el medicamento es una vacuna.

18. Kit que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

19. Kit que comprende el anticuerpo según la reivindicación 8.

20. Uso del kit según la reivindicación 19 para la detección y/o cuantificación del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

21. Uso del kit según la reivindicación 20 donde la detección y/o cuantificación del péptido se realiza en alimentos.

22. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 para el diagnóstico y/o seguimiento *in vitro* de la enfermedad celiaca en un individuo.

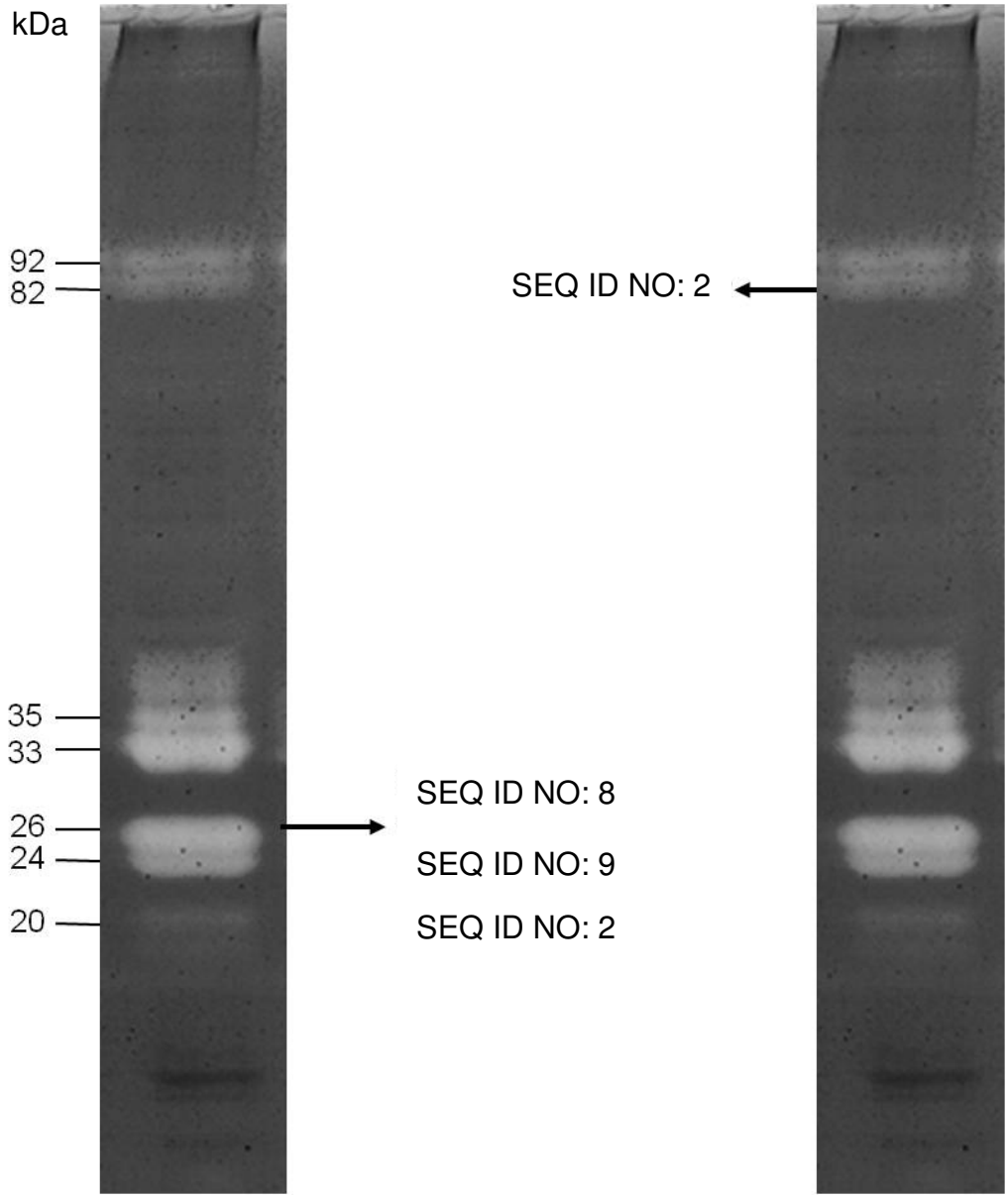

FIG. 1

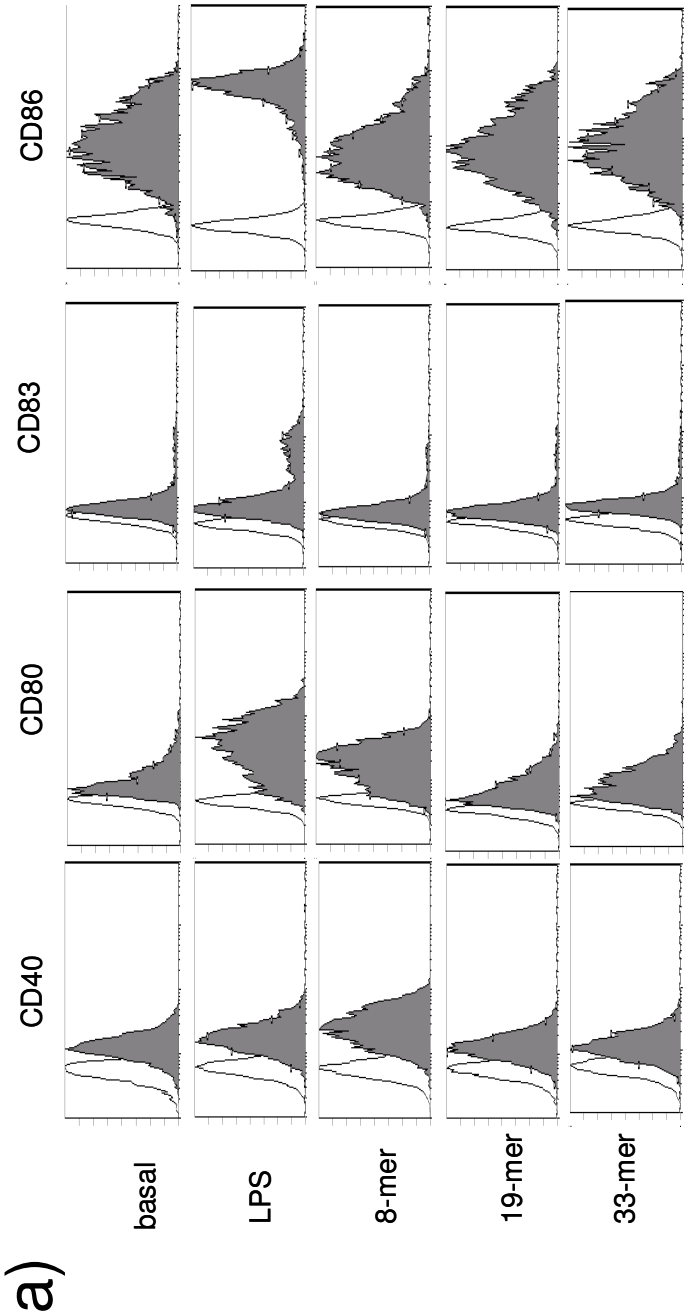

FIG. 2

b)

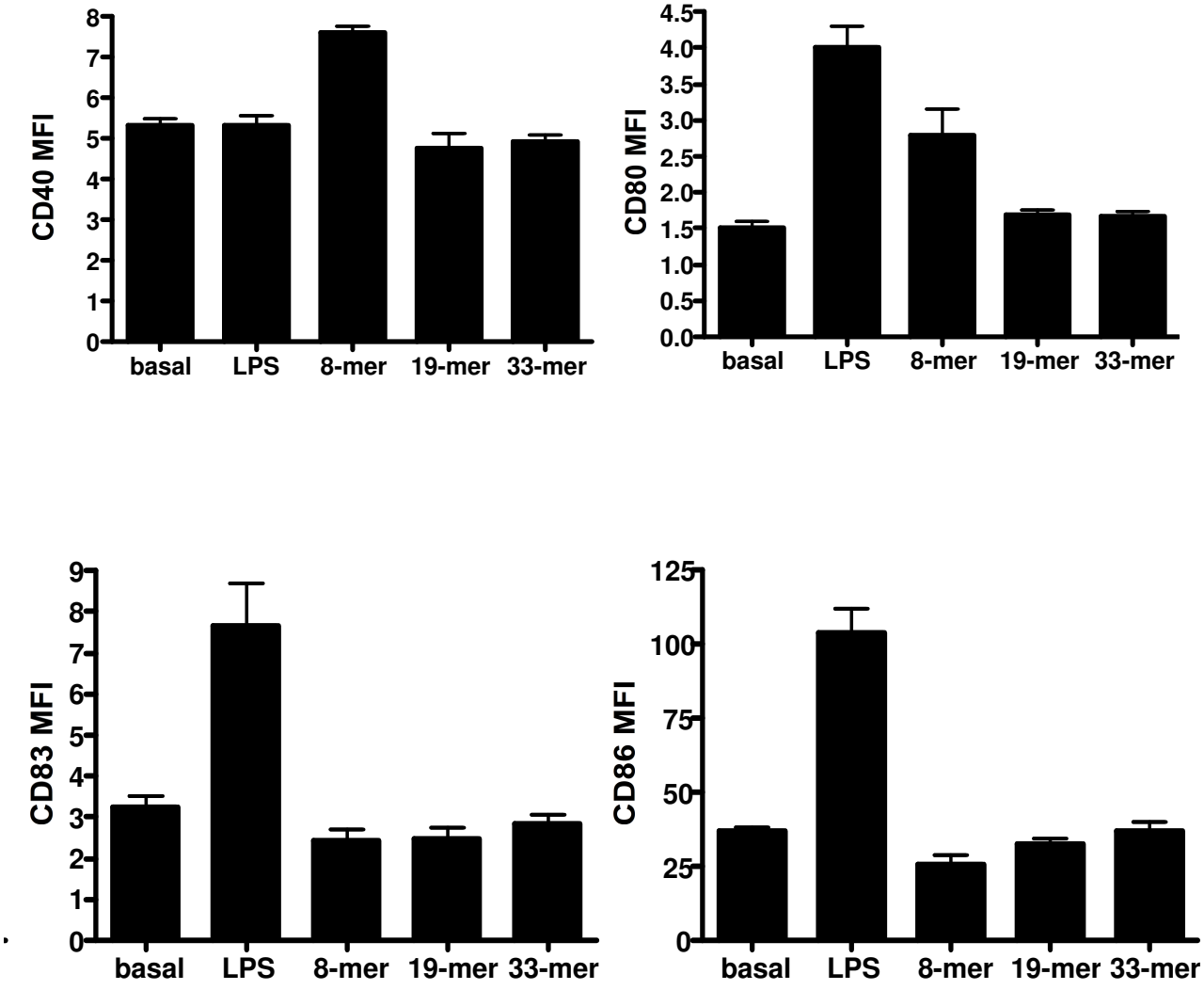
CD40 MFI
0
1
2
3
4
5
6
7
8
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
CD80 MFI
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
CD83 MFI
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
CD86 MFI
0
25
50
75
100
125
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer

FIG. 2 (cont.)

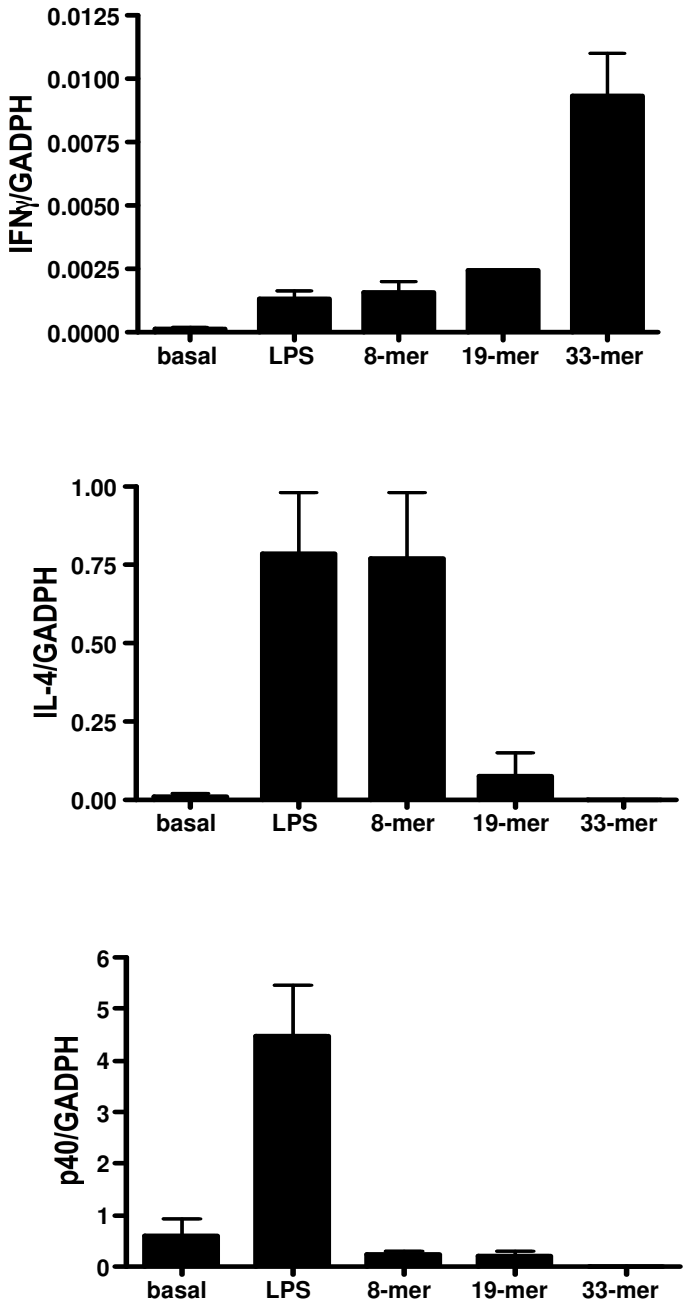
IFNγ/GADPH
0.0125
0.0100
0.0075
0.0050
0.0025
0.0000
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
IL-4/GADPH
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
p40/GADPH
6
5
4
3
2
1
0
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer

FIG. 3

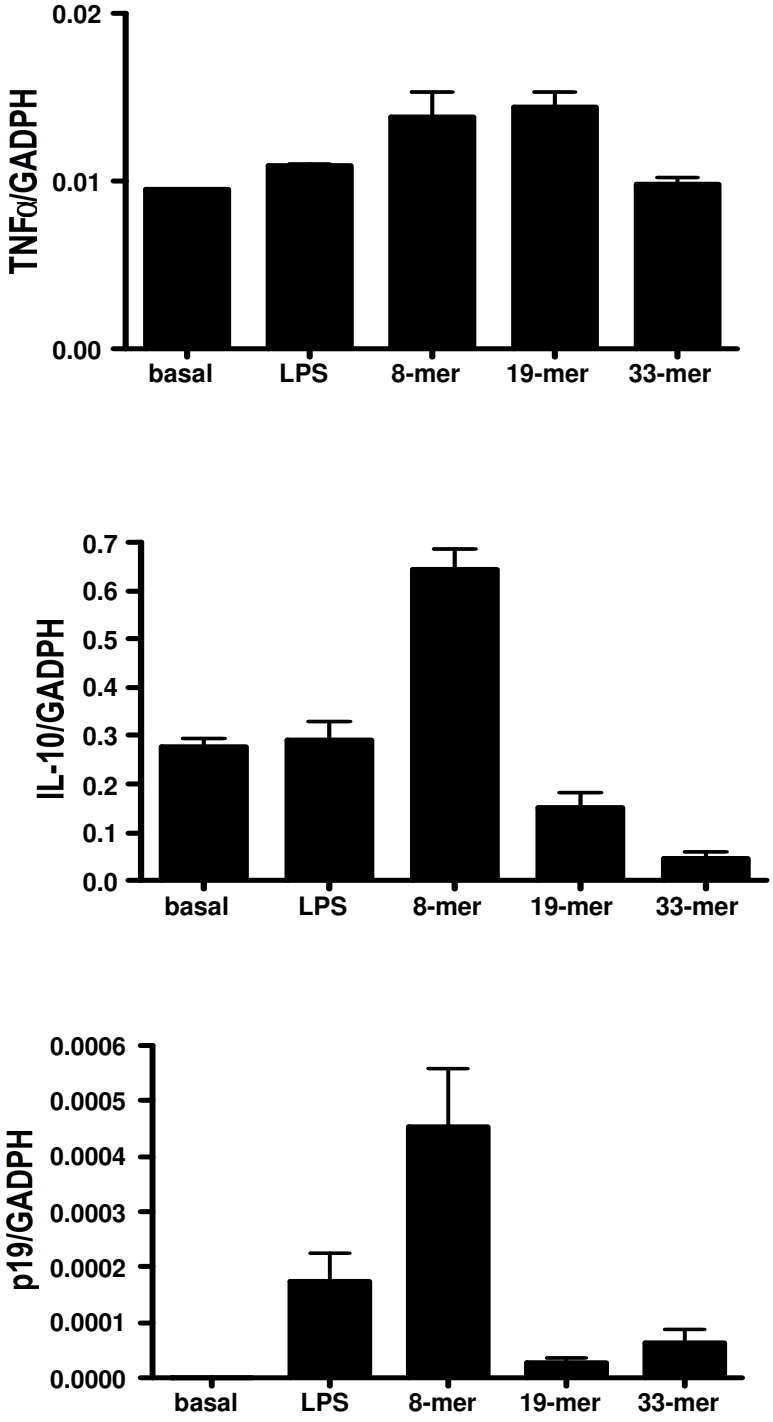
TNFα/GADPH
0.02
0.01
0.00
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
IL-10/GADPH
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
p19/GADPH
0.0006
0.0005
0.0004
0.0003
0.0002
0.0001
0.0000
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer

FIG. 3 (cont.)

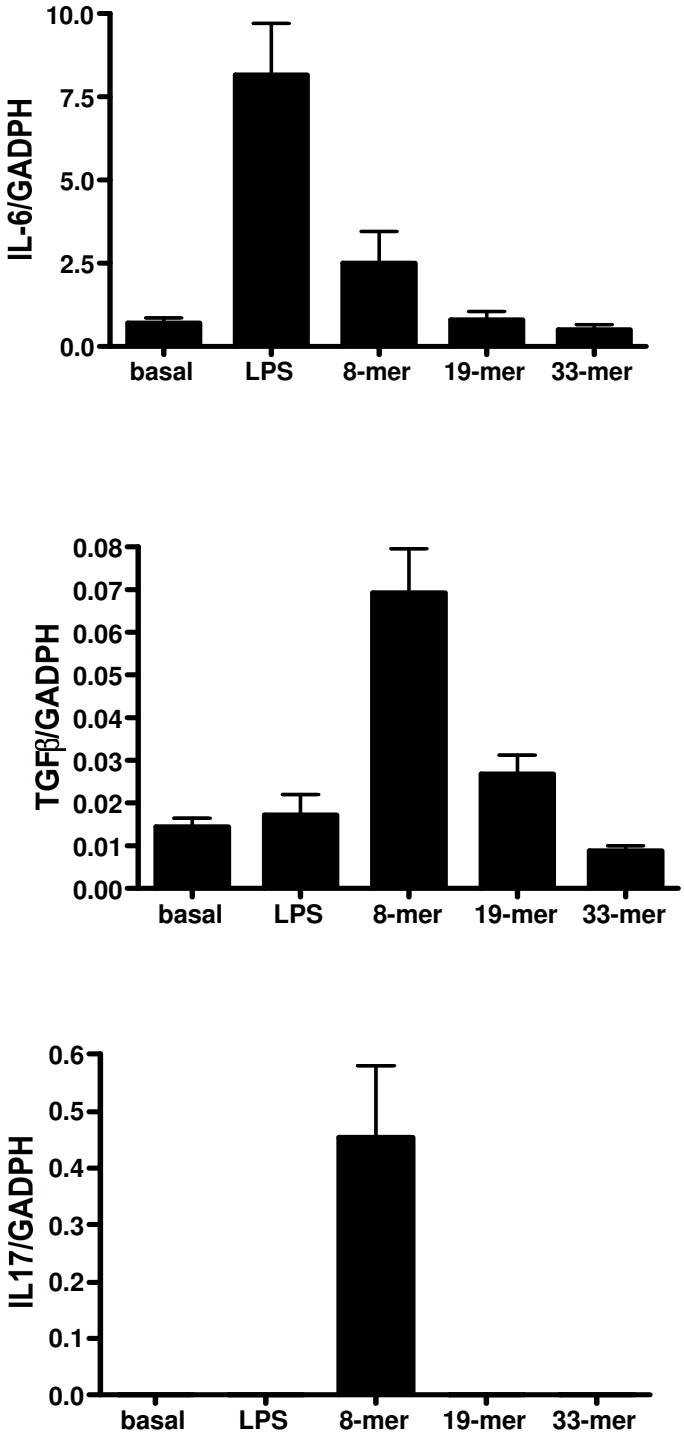
IL-6/GADPH
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
TGFβ/GADPH
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer
IL17/GADPH
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
basal
LPS
8-mer
19-mer
33-mer

FIG. 3 (cont.)

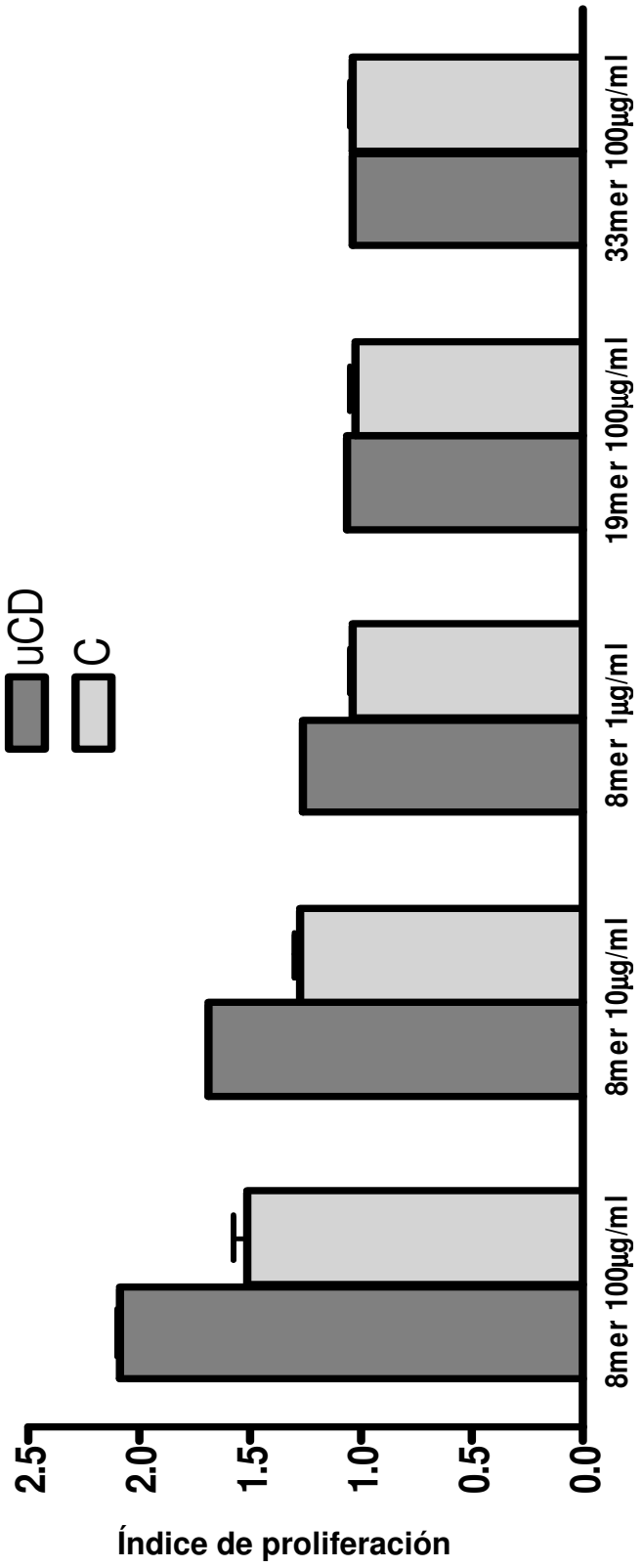
uCD
C
8mer 100µg/ml
8mer 10µg/ml
8mer 1µg/ml
19mer 100µg/ml
33mer 100µg/ml
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Índice de proliferación

FIG. 4

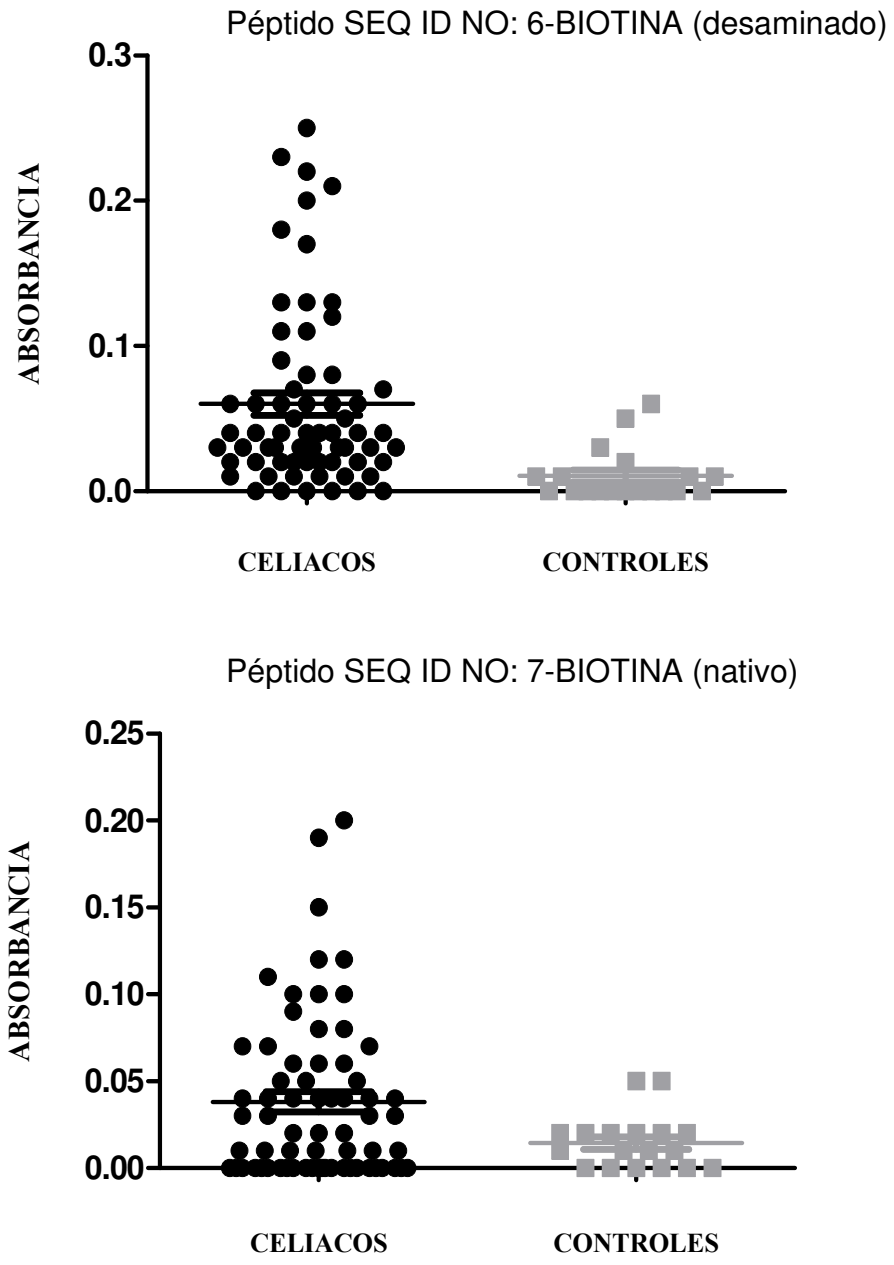
Péptido SEQ ID NO: 6-BIOTINA (desaminado)
ABSORBANCIA
0.3
0.2
0.1
0.0
CELIACOS
CONTROLES
Péptido SEQ ID NO: 7-BIOTINA (nativo)
ABSORBANCIA
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
CELIACOS
CONTROLES

FIG. 5

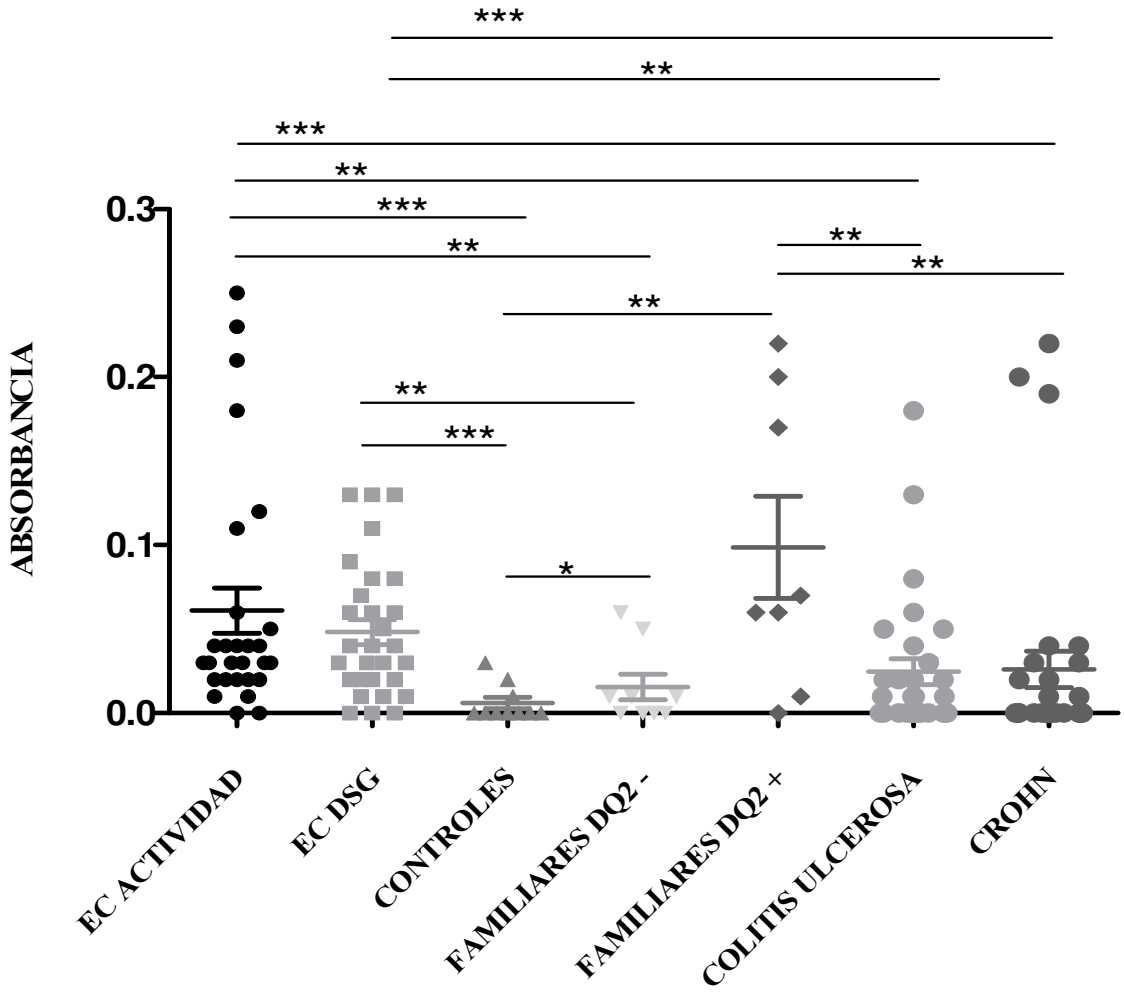
***
**
***
**
***
**
**
**
**
***
*
ABSORBANCIA
0.3
0.2
0.1
0.0
EC ACTIVIDAD
EC DSG
CONTROLES
FAMILIARES DQ2 -
FAMILIARES DQ2 +
COLITIS ULCEROSA
CROHN

FIG. 6

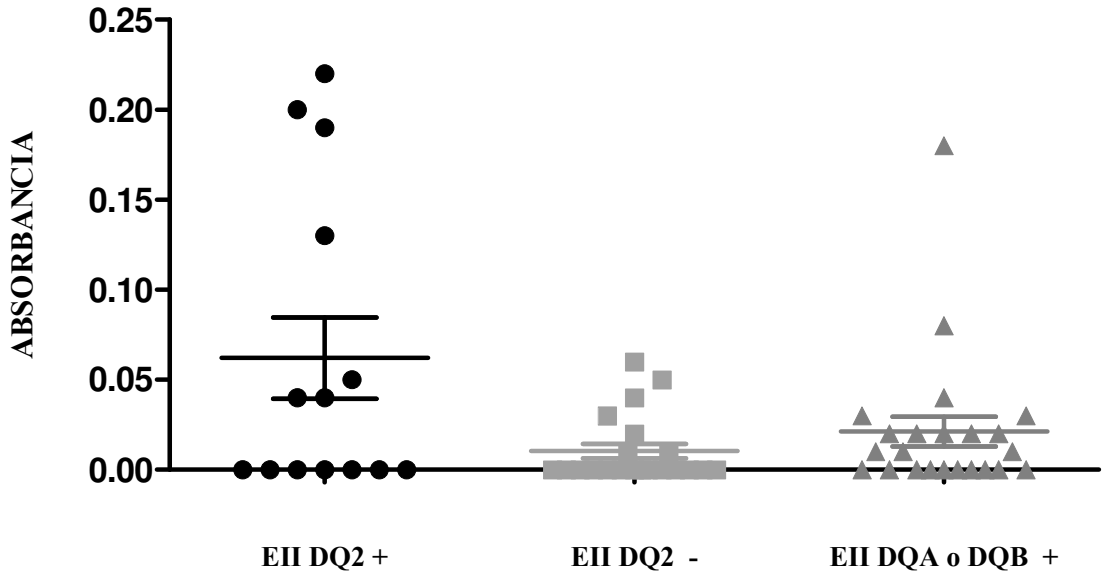
ABSORBANCIA
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
EII DQ2 +
EII DQ2 -
EII DQA o DQB +

FIG. 7

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Valladolid

<120> "Péptido inmunogénico del gluten y sus aplicaciones"

<130> ES2080.8

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Sustituible por Glu

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(7)
<223> Sustituible por Glu

<400> 1

Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 2

Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido 8-mer desaminado

<400> 3

Phe Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro
1 5

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Triticum monococcum

<400> 4

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

Gln Pro Phe

<210> 5
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido del gluten 33-mer

<400> 5

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

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

Phe

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SEQ ID NO: 3 con una lisina en su extremo C-terminal

<400> 6

Phe Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Lys
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SEQ ID NO: 2 con una lisina en su extremo C-terminal

<400> 7

Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Lys
1 5

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 8

Pro Phe Ile Gln Pro Ser Leu Gln Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys
1 5 10 15

<210> 9

<211> 18
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 9

Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Ala Met Pro Gln Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201131576

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	EP 0905518 A1 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL/NL]) 31.03.1999, página 2, párrafo 0005 – página 3, párrafo 0013; reivindicaciones 1-18.	1-22
A	US 20060240475 A1 (KHOSLA et al. [US/US]) 26.10.2006, página 2, párrafo 0005 – página 3, párrafo 0013; reivindicaciones 1-18.	1-22
A	EP 0821238 A2 (PICARELLI A. [IT/IT]) 23.07.1997, todo el documento.	1-22
A	CAMARCA A. et al. Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease. The Journal of Immunology 2009. Vol. 182(7), páginas: 4158-4166, todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
11.12.2012	M. D. García Grávalos	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K7/06 (2006.01)
G01N33/68 (2006.01)
A61K38/08 (2006.01)

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

C07K, G01N, A61K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-22	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-22	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0905518 A1	31.03.1999
D02	US 20060240475 A1	26.10.2006
D03	EP 0821238 A2	23.07.1997
D04	CAMARCA A. et al. The Journal of Immunology 2009. Vol. 182(7), páginas: 4158-4166.	01.04.2009

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

La presente invención divulga un péptido inmunogénico de ocho aminoácidos, que es segregado de forma natural en el intestino de pacientes celiacos por la hidrólisis del gluten ingerido y que se corresponde con las secuencias SEQ ID NO: 1-3, así como un anticuerpo frente a dicho péptido y una célula que lo expresa (reivindicaciones 1-9). Se refiere también al uso del péptido para preparar composiciones útiles para diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca (reivindicaciones 10-22).

El documento D01 divulga unos péptidos inmunogénicos, de entre 11 y 35 aminoácidos, obtenidos de prolaminas de cereales, que son reconocidos por células T específicas de gluten. Se refiere también al uso del péptido para preparar composiciones útiles para diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca (ver página 2, párrafo 0005 - página 3, párrafo 0013; reivindicaciones 1-18).

El documento D02 divulga unos péptidos tóxicos del gluten, obtenidos de pacientes celiacos y reconocidos por células T específicas, así como los anticuerpos que se unen a ellos y su uso para diagnóstico de la enfermedad celiaca (ver página 1, párrafo 0011; página 2, párrafo 0019 - página 5, párrafo 0035; reivindicaciones 1-24).

El documento D03 divulga un método de diagnóstico de la enfermedad celiaca mediante la detección de anticuerpos antiendomisiales, empleando péptidos procedentes de la gliadina (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un estudio sobre la identificación de péptidos del gluten, en pacientes celiacos adultos HLA-DQ2+, que son capaces de desencadenar una respuesta de las células T intestinales. Se refiere también a su utilidad para combatir la enfermedad celiaca por inmunoterapia (ver todo el documento).

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

La presente invención divulga un péptido inmunogénico de ocho aminoácidos, que corresponde a las secuencias SEQ ID NO: 1-3, un anticuerpo frente a dicho péptido y una célula que lo expresa; así como su uso para preparar composiciones útiles para diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

1.1. REIVINDICACIONES 1-22

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos al estado de la técnica, ya que anticipan unos péptidos inmunogénicos, de entre 9 y 35 aminoácidos, que son reconocidos por células T específicas de gluten y su uso para preparar composiciones útiles para diagnóstico, prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca.

La diferencia entre los documentos citados y la presente invención radica en la secuencia de aminoácidos que forma el péptido reivindicado que no ha sido encontrada en el estado de la técnica, por lo que se considera que la invención proporciona un péptido nuevo y unas composiciones nuevas, alternativas a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-22 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

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