(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 563 731**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2010 E 10761001 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2483291**

(54) Título: **Nuevos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad celíaca**

(30) Prioridad:

01.10.2009 DE 102009045268

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2016

(73) Titular/es:

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN (100.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

SKRINER, KARL

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 563 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (de acuerdo con la CIE-10, OMS 2006 versión: K90.0), también denominada como enteropatía sensible al gluten o inducida por gluten, infantilismo intestinal; o esprúe no tropical o endémico, intolerancia al gluten o enfermedad de Heubner-Herter en adultos, es una enfermedad crónica de la mucosa del intestino delgado que se produce por una hipersensibilidad al gluten, una proteína que se encuentra en muchos tipos de granos. La intolerancia permanece a lo largo de toda la vida y en parte está determinada genéticamente, y en el momento actual no puede ser tratada causalmente.

Los alimentos que contienen gluten dan lugar a la inflamación de la mucosa del intestino delgado con destrucción frecuentemente exhaustiva de las células epiteliales intestinales, de modo que los nutrientes se absorben mal y permanecen sin digerir en los intestinos. Por consiguiente, los síntomas son pérdida de peso, diarrea, vómitos, anorexia, fatiga, irritabilidad y, como mínimo, retraso del desarrollo durante la infancia. La gravedad de la afección puede variar ampliamente, haciendo más difícil el diagnóstico precoz. La enfermedad celíaca no tratada aumenta el riesgo de aparición de linfoma non Hodgkin así como de carcinomas del tracto digestivo, tal como cáncer intestinal. En el momento actual, el único tratamiento para la enfermedad celíaca consiste en la dieta sin gluten.

Entre tanto, se han identificado varios fragmentos peptídicos del gluten nocivos. Todos ellos pertenecen a la fracción soluble en alcohol (las así llamadas prolaminas) y se denominan gliadina. En individuos susceptibles, estos fragmentos peptídicos dan lugar a una reacción compleja de la mucosa intestinal y del sistema inmunitario. Las células de la mucosa del intestino delgado producen cantidades crecientes de diversas clases de HLA (HLA-I, -DR y -DQ). Determinados péptidos gliadina se unen al HLA-DQ2 producido en cantidades crecientes. Dicha unión se aumenta como resultado de la formación de ácido glutámico a partir del aminoácido glutamina, que está presente en el péptido en gran número. La enzima transglutaminasa tisular media la formación de ácido glutámico, en particular la transglutaminasa tisular 2 (TGt2). Como resultado de este cambio, la correspondiente sección de gliadina tiene un mejor ajuste en los “bolsillos” de las proteínas del HLA. El complejo de péptido de gliadina y HLA-DQ2 a su vez se une a linfocitos T colaboradores CD4+, provocando en el lugar la producción aumentada de diversos mediadores inflamatorios, por ejemplo, interferón γ, TNFα, interleucina 6 e interleucina 2. Durante el proceso adicional de inflamación se forman diversos anticuerpos. Además de los anticuerpos contra los propios péptidos de gliadina (anticuerpos contra gliadina, ACG), están los así llamados autoanticuerpos contra antígenos endógenos. La transglutaminasa tisular, particularmente la TGt2, ha sido identificada como el autoantígeno responsable de forma principal. En vista de estos hallazgos, la enfermedad celíaca, en términos patofisiológicos, se entiende que es una forma mixta de alergia y de enfermedad autoinmunitaria, en la que el componente alérgico en la forma de hipersensibilidad a la proteína gliadina exógena representa el factor precipitante, mientras que la respuesta autoinmunitaria contra estructuras endógenas es responsable de la gravedad de los síntomas. Finalmente, el proceso inflamatorio da lugar a la apoptosis de enterocitos, conduciendo con el tiempo a una pérdida más o menos pronunciada de las vellosidades del intestino delgado. Como resultado de la superficie de absorción reducida, la mucosa del intestino delgado de esta forma dañada ya no es capaz de transferir de forma suficiente los alimentos suministrados al torrente sanguíneo.

En general, el diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca implica analizar la presencia de anticuerpos tipo IgA y/o IgG contra gliadina o contra TGt2 (Villalta *et al*., Clinica Chimica Acta 382 (2007) 95-99; Lewis *et al*., Aliment Pharmacol Ther 31 (2009)73-81). Un problema de los bien conocidos marcadores de diagnóstico es que la sensibilidad de las pruebas todavía no es óptima. En particular, las pruebas para la presencia de anticuerpos contra gliadina muestran sensibilidades bajas, de menos del 80 %. Mientras que las pruebas bien conocidas para anticuerpos contra TGt2 son más sensibles en su conjunto, los epítopos informativos de TGt2 son los así llamados epítopos conformacionales, es decir epítopos que los anticuerpos pueden reconocer solo si TGt2 está presente en un estado no desnaturalizado. En consecuencia, las pruebas para anticuerpos contra TGt2 se limitan a los métodos de prueba en los que el antígeno TGt2 está presente en un estado no desnaturalizado.

El objetivo de la presente invención es paliar o evitar una o más de las desventajas de la técnica anterior. Más específicamente, el objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

Dicho objetivo se consigue proporcionando un péptido que contiene, o consiste en, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, o SEC ID Nº: 4.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los anticuerpos producidos en pacientes celíacos reconocen de forma específica el péptido de acuerdo con la invención. Se ha demostrado que el péptido de la invención se puede utilizar para identificar incluso a los pacientes celíacos en los que el reconocimiento por medio de una o más pruebas de diagnóstico serológico convencionales de enfermedad celíaca no han sido posibles. Además, se ha demostrado que el péptido de acuerdo con la invención no es un así llamado epítopo conformacional, pero los anticuerpos de sueros de pacientes pueden también reconocerlo en forma desnaturalizada. En consecuencia, el péptido es también adecuado para tipos y variantes de las pruebas en las que, por ejemplo, de

momento no se pueden utilizar ensayos basados en TGt2 y en las que el epítopo para la detección por anticuerpos se utiliza en estado desnaturalizado, tal como procedimientos de transferencia Western. De forma más específica, se ha demostrado que un péptido de acuerdo con la invención, que comprende una secuencia de las SEC ID Nº: 2, 3 y 4, y la secuencia de TGt2 de ser humano, se puede utilizar para proporcionar un ensayo de diagnóstico para la enfermedad celíaca que tenga una sensibilidad que sea mayor que la sensibilidad de cualquier ensayo de diagnóstico conocido para la enfermedad celíaca.

Para el fin de la presente invención, el término “péptido” se entiende que indica cualquier molécula que tenga un enlace peptídico entre al menos dos aminoácidos. Un enlace peptídico (-NH-CO-) es un enlace de tipo amida entre el grupo carboxilo de un primer aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido. En principio, el término “péptido” por lo tanto comprende dipéptidos, oligopéptidos, polipéptidos y proteínas, cuyos péptidos pueden tener modificaciones.

El péptido de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 1. Además, el péptido de la invención comprende aminoácidos o secuencias de aminoácidos adicionales.

Los aminoácidos son una clase de compuestos orgánicos con al menos un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino ($-NH_2$). Los aminoácidos presentes en el péptido de acuerdo con la invención son preferentemente aminoácidos α, ß o y, más preferentemente aminoácidos α. Se pueden incluir en el péptido aminoácidos de los 20 aminoácidos de origen natural, pero también se pueden incluir los aminoácidos α, ß o y que no son de origen natural.

Se pueden modificar uno o más aminoácidos del péptido de acuerdo con la invención. Se entiende que un aminoácido modificado es un aminoácido que porta un grupo funcional en su cadena lateral. El rasgo característico de un grupo funcional es que el grupo confiere una función o propiedad adicional al péptido, que no está o no está suficientemente presente en el péptido de la invención sin el grupo funcional, no estando dicho grupo funcional implicado de forma directa en la unión específica del péptido de la invención a los anticuerpos del suero de pacientes celíacos. Ejemplos de grupos funcionales son los grupos marcadores, tales como GFP, etiqueta His, etiqueta AVI, etiqueta de biotina, etc., permitiendo, por ejemplo, la detección, la acumulación y/o la purificación del péptido de acuerdo con la invención. Otros grupos funcionales son grupos de acoplamiento que permiten por ejemplo el acoplamiento reversible o irreversible o la inmovilización del péptido de la invención a otras moléculas y/o transportadores. Con la ayuda de tales grupos de acoplamiento se puede, por ejemplo, unir el péptido de acuerdo con la invención a una molécula, tal como BSA o a una micropartícula, o si se necesita se puede inmovilizar en un transportador adecuadamente preparado. Por ejemplo, un péptido biotinilado se puede inmovilizar muy eficazmente en una superficie pretratada con estreptavidina (neutravidina). Ejemplos de tales grupos de acoplamiento son la biotina, la estreptavidina, etc., pero es posible también utilizar grupos químicamente reactivos tales como grupos carboxilo, amino o amida. Los marcadores adecuados y/o los grupos de acoplamiento son bien conocidos para los expertos en la materia.

Además de las modificaciones opcionales presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos individuales del péptido de acuerdo con la invención, la presente invención también comprende péptidos que portan modificaciones en sus extremos N- y/o C- terminales. Además de los grupos funcionales anteriormente mencionados, el péptido puede tener grupos funcionales en sus extremos N- y/o C- terminales, los cuales por ejemplo aumentan la estabilidad del péptido o facilitan la accesibilidad del epítopo incluido en el péptido de acuerdo con la invención. Por lo tanto, por ejemplo, el péptido se puede hacer más estable mediante el acoplamiento del péptido a anticuerpos.

El péptido de acuerdo con la invención puede tener secuencias de aminoácidos adicionales además de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID Nº: 2, 3 y/o 4. Por ejemplo, el péptido puede comprender una pluralidad de copias de una única secuencia de las SEC ID Nº: 2, 3 y 4.

El péptido de acuerdo con la invención puede tener una o más secuencias de aminoácidos que actúen como enlazadores y/o grupos funcionales. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden unir dos regiones de secuencia de aminoácidos de un péptido entre sí mediante un enlazador. Por ejemplo, se puede denominar enlazador una secuencia de aminoácidos que conecte a través de enlaces peptídicos dos partes del péptido de la invención a unir, de tal forma que se forme una cadena de aminoácidos continua. Tales enlazadores también se pueden denominar como enlazadores peptídicos. Una parte del péptido de acuerdo con la invención también puede estar en la forma de un grupo funcional. Tal grupo funcional puede implicar a los grupos funcionales descritos anteriormente, incorporados a una cadena lateral de uno o más aminoácidos del péptido de acuerdo con la invención, o situados en los extremos N- y/o C- terminales del péptido. También, pueden estar en la forma de una secuencia de aminoácidos y representar un componente integral de la cadena continua de aminoácidos del péptido de acuerdo con la invención. Tales grupos funcionales peptídicos pueden comprender cadenas de aminoácidos que tienen uno o más aminoácidos o pueden comprender proteínas enteras o subunidades funcionales de proteínas. Ejemplos de tales grupos funcionales son marcadores utilizados en la detección y la purificación, tales como etiqueta His, GFP, etc., o epítopos seleccionados, tales como porciones de la secuencia entera de la TGt2 de ser humano (transglutaminasa tisular 2 de ser humano) de la SEC ID Nº: 5.

Más específicamente, el péptido de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente una secuencia de al menos 25 aminoácidos consecutivos, preferentemente 100 aminoácidos consecutivos, de la secuencia de TGt2 de ser humano de la SEC ID Nº: 5. En principio, las porciones que forman parte del péptido de acuerdo con la invención se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de TGt2 de la SEC ID Nº: 5. En un modo preferente la porción se selecciona de tal forma que comprende al menos un epítopo que se puede reconocer mediante anticuerpos del suero de pacientes celíacos. En un modo particularmente preferente, el péptido de la invención comprende una o más secuencias parciales de TGt2 o una o más copias de la secuencia entera de TGt2 de la SEC ID Nº: 5, además de una o más secuencias de aminoácidos de las SEC ID Nº: 2, 3 y/o 4. Además, el péptido de la invención puede comprender secuencias de aminoácidos y/o grupos funcionales adicionales, tales como etiqueta His, en particular una etiqueta de 6 histidinas (6xHis). Más específicamente, el péptido de la invención puede tener o consistir en una secuencia de la SEC ID Nº: 6 [SEC ID Nº: 5 + 2] o SEC ID Nº: 7 [SEC ID Nº: 5 + 2 + 2].

La presente invención también se refiere a un péptido de la invención para su uso como medicamento, por ejemplo para su uso en diagnóstico, especialmente en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

El péptido de acuerdo con la invención se puede preparar de forma sintética mediante la unión controlada de aminoácidos seleccionados. De forma alternativa, el péptido de la invención se puede preparar mediante ingeniería genética, en la que un ácido nucleico que codifica el péptido respectivo se proporciona y coloca en un contexto que permite la expresión y, opcionalmente, la posterior purificación del péptido codificado. Por ejemplo, la expresión se puede efectuar *in vitro* o en células transfectadas de forma transitoria o estable, o en microorganismos transformados. Los métodos adecuados son bien conocidos para los expertos en la materia y se han descrito por ejemplo en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, o Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY (1989), y en siguientes cuestiones.

La presente invención también se refiere a una ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención. Una persona experta en la materia conocerá que el código genético es degenerado y, comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos particular del péptido de acuerdo con la invención, será capaz de determinar las posibles secuencias de ácido nucleico de un ácido nucleico de la invención sin excesivo esfuerzo. De forma semejante, comenzando a partir de una dada secuencia de ácido nucleico y teniendo en cuenta la degeneración del código genético, un experto en la materia puede determinar claramente y sin ambigüedad, sin esfuerzo excesivo, si una dada secuencia de ácido nucleico codificará o no un péptido de acuerdo con la invención. El ácido nucleico de la invención comprende ADN, ARN, mezclas y/o derivados funcionales de los mismos, en particular ADNc, ADN genómico, ADN lineal o circular, por ejemplo vectores, ARNm, ARN lineal o circular, y se puede preparar parcial o completamente por medio de síntesis o de ingeniería genética. El ácido nucleico puede estar en forma monocatenaria, o en forma parcialmente o completamente bicatenaria.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención es preferentemente un ácido nucleico aislado. Para los fines de la presente invención, “aislado” significa que el componente aislado se ha separado de su contexto natural. Utilizando el ejemplo de un ácido nucleico aislado, se proporcionará a continuación una ilustración ejemplar de lo que comprende como mínimo el término “aislado”. Por ejemplo, un ácido nucleico está aislado si el hombre lo ha modificado intencionadamente y/o si el ácido nucleico se ha transferido a un entorno distinto del entorno natural o a un lugar distinto de su locus natural. De forma semejante, un ácido nucleico está aislado en el significado de la invención si existe en una forma purificada o separada de su entorno natural, preferentemente en una forma sustancialmente pura y/o homogénea, o sustancialmente libre de ácidos nucleicos que no son ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Un ácido nucleico clonado es en general un ácido nucleico aislado.

La presente invención también comprende microorganismos transformados o células transformadas que comprenden un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Esto incluye microorganismos y células transformados de forma transitoria o estable, o transfectados con un ácido nucleico de la invención situado en ellos, en cuyo suceso el ácido nucleico de la invención puede, por ejemplo, existir en forma libre en el microorganismo o célula, o incorporarse en el genoma. Los microorganismos de acuerdo con la invención son organismos unicelulares, preferentemente bacterias u hongos unicelulares tales como levaduras. Las células de acuerdo con la invención son células de organismos pluricelulares, preferentemente células aisladas, por ejemplo células que permitan el cultivo *in vitro* en un cultivo celular. Por ejemplo, las células pueden ser células primarias o células inmortalizadas. En particular, son preferentes los microorganismos o células que se pueden utilizar o se han utilizado en la preparación de péptidos y/o proteínas.

La presente invención también se refiere a anticuerpos aislados que se unen a un péptido de acuerdo con la invención. Un anticuerpo se entiende que es una proteína que tiene uno o más sitios de unión a antígeno específicos (CDR, región determinante de complementariedad). Los anticuerpos en el significado de la invención, incluyen anticuerpos policlonales o monoclonales que tienen una estructura clásica de anticuerpos y derivados o fragmentos derivados de los mismos, tales como Fab, Fab_2, monocatenarios, etc. Partiendo de un péptido particular de acuerdo con la invención, un experto en la materia es capaz, sin esfuerzo excesivo, de generar un anticuerpo aislado que se una específicamente a dicho péptido. Tales técnicas y estrategias son bien conocidas para los expertos en la materia y son rutinarias en la práctica diaria del laboratorio. Por ejemplo, los anticuerpos aislados de la invención también se pueden generar de modo tal que, mediante el uso de un péptido de acuerdo con la invención, los

anticuerpos presentes en el suero de pacientes celíacos se aíslan, purifican y de esta manera se hacen más accesibles. Con este fin, el péptido de la invención puede acoplarse, por ejemplo, a un soporte, y el soporte cargado con el péptido posteriormente se pone en contacto con el suero de pacientes celíacos. Los componentes del suero unidos de forma no específica se eliminan, y posteriormente los anticuerpos unidos de forma específica al péptido de la invención se eluyen.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para la detección de patógenos, por ejemplo patógenos peptídicos, asociados a la enfermedad celíaca, preferentemente para la detección *in vi*tro de tales patógenos. En un modo preferente tales patógenos se pueden detectar en alimentos para, por ejemplo, aprobar determinados alimentos para pacientes celíacos o eliminarlos de una lista de alimentos tolerables.

La invención también se refiere a un método para determinar la seguridad de alimentos destinados para el consumo de pacientes celíacos, cuyo método se caracteriza por que la presencia de patógenos asociados a la enfermedad celíaca en tales alimentos se determina utilizando los anticuerpos aislados de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere a un método para la detección *in vitro* de anticuerpos contra un péptido de acuerdo con la invención en una muestra. El método de la invención se caracteriza por que:

i) un péptido de acuerdo con la invención se pone en contacto con una muestra *in vitro*, y
ii) se detecta el anticuerpo unido al péptido.

Para los fines de la presente invención, la expresión "*in vitro*" se entiende que indica cualquier entorno que no está dentro de un organismo completo, por ejemplo un cuerpo humano o animal.

Se entiende que un anticuerpo es una proteína que tiene uno o más sitios de unión a antígeno específicos (CDR, región determinante de complementariedad). Anticuerpos en el significado de la invención incluye anticuerpos policlonales o monoclonales que tienen una estructura de anticuerpo clásica y derivados o fragmentos derivados de los mismos, tales como Fab, Fab_2, monocatenarios, etc.

Se entiende que una mezcla es cualquier composición a investigar. Preferentemente, la muestra es un material biológico o médico, es decir, material obtenido a partir de un organismo, partes de un organismo, o a partir de células. Antes de su uso como muestra en el método de acuerdo con la invención, el material se puede someter a etapas de tratamiento adicionales para por ejemplo acondicionar el material de tal forma que se lo haga particularmente adecuado como muestra en el método. Más preferentemente, la muestra es un material obtenido a partir de un líquido corporal o constituido de un líquido corporal. Preferentemente los líquidos corporales son sangre, plasma, suero, líquido sinovial, orina, deposición, líquido intersticial, linfa, saliva, sudor, líquido cefalorraquídeo y/o secreción lacrimal. Particularmente preferente son los líquidos corporales en los que están presentes anticuerpos a altas concentraciones. Especialmente preferente, el fluido corporal es de origen humano.

En el método de acuerdo con la invención, un péptido de la invención se pone en contacto *in vitro* con una muestra a investigar. La etapa de contacto se utiliza para permitir que los anticuerpos posiblemente incluidos en la muestra se unan a un epítopo del péptido de acuerdo con la invención. Con este fin, la etapa anterior se lleva a cabo en condiciones y en un entorno que permiten la unión específica antígeno-anticuerpo. Las condiciones adecuadas son bien conocidas para los expertos en la materia. Tales condiciones preferentemente comprenden un entorno líquido y/o contacto a una temperatura de desde > 0 °C a < 60 °C. Dicho contacto preferentemente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo que permita la formación de un enlace antígeno-anticuerpo específico entre el péptido de la invención y un anticuerpo específico de péptido incluido posiblemente en la muestra. La etapa de contacto se realiza preferentemente durante un periodo de más de 30 s, más preferentemente de más de 2 min, y de manera especial preferentemente durante un periodo de desde 2 min a 48 h.

El anticuerpo unido de forma específica al péptido de la invención se detecta en una etapa posterior del método de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede detectar el anticuerpo unido de forma específica al péptido de la invención de tal modo que el contacto esté seguido de la eliminación de componentes de la muestra no unidos al péptido de la invención, por ejemplo por medio de una o más etapas de lavado, purificación o aislamiento, y el uso posterior de agentes que permiten la detección específica de anticuerpos. La detección anterior se puede efectuar en una o más etapas. Por ejemplo, los agentes utilizados para la detección específica de anticuerpos pueden ser ellos mismos anticuerpos. La detección se puede efectuar utilizando, por ejemplo, una reacción de color mediada o inducida de forma directa o indirecta por los agentes para la detección de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos para la detección de anticuerpos específicos se pueden unir a grupos funcionales o moléculas (por ejemplo enzimas) capaces de mediar o de inducir una reacción de color en condiciones específicas.

En el método de acuerdo con la invención, el péptido de la invención puede estar inmovilizado en un soporte durante una o más, o todas las etapas del procedimiento. Se entiende que la inmovilización es cualquier acoplamiento, unión u otra asociación entre el péptido de la invención y el soporte que evita el movimiento separado del péptido y el soporte. Por ejemplo, se pueden utilizar como soporte las moléculas y/o superficies configuradas de tal modo que permitan la unión reversible o irreversible del péptido de la invención. Con este fin, el soporte y/o el péptido de la

invención pueden tener grupos funcionales que promueven y/o permiten la unión entre el péptido y el soporte. Se pueden mencionar como soportes ejemplares moléculas tales como BSA, TGt, o superficies tales como las que presentan macropartículas, nanopartículas o esferas magnéticas, o superficies de membranas seleccionadas, polímeros (por ejemplo poliestireno), o placas de microtitulación o tiras reactivas que comprendan tales superficies. Los soportes adecuados y modos posibles de unión del péptido y el soporte son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Más específicamente, el método de acuerdo con la invención se puede realizar en la forma de un procedimiento de inmunoensayo, y los procedimientos de inmunoensayo adecuados se han descrito en David Wild (Ed.), The Immunoassay Handbook. 3ª Edición. Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, Boston, Oxford 2005.

En un modo preferente, el método de acuerdo con la invención se puede realizar en la forma de un procedimiento de ELISA (ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), y las técnicas adecuadas de ELISA se han descrito por ejemplo en Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. y Kuby, J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; en: Immunology, 5ª edición., pág. 148-150. W.H. Freeman, Nueva York, 2003. Con este fin, se puede poner en contacto una muestra con un péptido de la invención inmovilizado sobre un soporte, los componentes no unidos se eliminan de forma parcial o sustancial, si es necesario, y posteriormente se utiliza un anticuerpo acoplado o acoplable a un grupo funcional para detectar un anticuerpo de la muestra unido al péptido. Como regla, la detección procede a través de una reacción detectable de forma visual. Por ejemplo, el anticuerpo utilizado en la detección puede ser específico para anticuerpos de un organismo particular o de un origen particular y/o para una forma específica de anticuerpo, preferentemente para un isotipo particular, por ejemplo anticuerpos de tipo IgA, IgM y/o IgG, más preferentemente para IgA, IgM y/o IgG de ser humano.

El método de acuerdo con la invención también se puede llevar a cabo en otros formatos de ensayo, preferentemente, por ejemplo, como un RIA (ensayo radioinmunológico) o como un inmunoensayo en un formato de tira reactiva.

El presente método es adecuado para la detección de anticuerpos contra un péptido de acuerdo con la invención, particularmente para la detección de anticuerpos de tipo IgA, IgM y/o IgG, preferentemente para la detección de anticuerpos de origen humano. El método de acuerdo con la invención se puede utilizar en diagnóstico, especialmente en el diagnóstico serológico, preferentemente en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

La presente invención también comprende un kit para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención. Con este fin, el kit puede incluir un péptido de la invención inmovilizado sobre un soporte. Además, el kit puede incluir instrucciones para el uso del kit y/o la realización del método de la invención por medio de dicho kit. En un modo preferente, el kit está diseñado en la forma de un ELISA, o en particular como una tira reactiva. Esto es, el kit de acuerdo con la invención comprende el péptido de la invención y opcionalmente componentes adicionales para llevar a cabo el método de la invención, en una forma adecuada para realizar el método de acuerdo con la invención en un formato de ELISA y/o de tira reactiva. Más específicamente, el kit puede comprender el péptido de la invención acoplado a una tira reactiva. El kit de acuerdo con la invención puede opcionalmente incluir componentes adicionales para llevar a cabo el método de la invención. Por ejemplo, tales componentes pueden comprender recipientes de reacción, filtros, soluciones y/o otros agentes. En particular, el kit de acuerdo con la invención puede incluir agentes para la detección de anticuerpos, preferentemente anticuerpos de tipo IgA, IgM y/o IgG, más preferentemente para la detección de anticuerpos de origen humano.

El kit de acuerdo con la invención se puede utilizar para llevar a cabo un método de la invención. Más específicamente, el kit de acuerdo con la invención es adecuado para su uso en diagnóstico, preferentemente en el diagnóstico serológico, y en especial preferentemente en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

El kit de acuerdo con la invención se puede caracterizar en que el kit adicionalmente incluye agentes para la detección de anticuerpos de tipo IgA, IgM y/o IgG, preferentemente para la detección de anticuerpos de tipo IgA, IgM y/o IgG de ser humano.

En particular, el kit de acuerdo con la invención se puede utilizar en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

Figuras:

La Fig. 1 muestra las sensibilidades de los ELISA de IgA e IgG anti gliadina disponibles de forma comercial así como de los ELISA de IgA e IgG anti TGt, en comparación con un ELISA de CD3, e indica la tasa porcentual de sueros de pacientes celíacos clasificados correctamente como una medida de la sensibilidad de cada prueba.

La Fig. 2 muestra las sensibilidades de los ELISA de IgA e IgG anti gliadina disponibles de forma comercial así como de los ELISA de IgA e IgG anti TGt en comparación con el ELISA CDPTGt y TGt, utilizando el protocolo de ELISA de CDPTGt, e indica la tasa porcentual de los sueros de pacientes celíacos clasificados correctamente como una medida de la sensibilidad de cada prueba.

La Fig. 3 muestra los solapamientos de sensibilidad entre las formas de ELISA individuales utilizadas e indica el porcentaje de sueros de celíaco no reconocidos mediante las pruebas citadas que fueron positivos en el análisis con los respectivos ensayos.

La Fig. 4 muestra que los anticuerpos específicos de CD3 aislados a partir de sueros de pacientes pueden reconocer de forma específica CDPTGt en una transferencia Western.

Ejemplos:

1. Preparación y purificación de CD3, TGt y CDTGt

CD3 de la SEC ID Nº: 4 se preparó mediante síntesis y se biotiniló en el resto lisina C-terminal.

Se clonó TG2t de ser humano de la SEC ID Nº: 5, en lo sucesivo en el presente documento denominada como TGt, en un vector con etiqueta 6xHis eliminable para la expresión recombinante y se expresó de acuerdo con un protocolo convencional, se aisló utilizando columna de purificación NINTA, y se eliminaron las 6xHis.

Así mismo, se clonó CDPTGt de la SEC ID Nº: 6, en lo sucesivo en el presente documento denominado como CDTGt, en un vector con etiqueta 6xHis C-terminal para la expresión recombinante, y se expresó de acuerdo con un protocolo convencional, se aisló utilizando purificación en columna NINTA, y se eliminó la etiqueta His.

2. ELISA para CD3, TGt (preparada en el laboratorio) y CDTGt

Para detectar anticuerpos específicos de CD3, se desarrolló un ELISA de péptido CD3 en la que CD3 biotinilado de la SEC ID Nº: 4 se acopló de forma inicial sobre una placa de microtitulación recubierta de neutravidina, seguido del protocolo a continuación:

ELISA de neutravidina-péptido CD3

Los pocillos de la placa de microtitulación se bloquearon de forma inicial con tampón PBS/MP al 5 % durante una noche. Posteriormente, los péptidos biotinilados se aplicaron utilizando 500 pmol/pocillo en tampón PBS cada vez. Después de la incubación durante 2 h, las placas recubiertas con CD3-neutravidina se lavaron 4 veces con PBS/ Tween al 0.1 % y se incubaron durante 1 hora con suero del paciente a una dilución de 1:800 en PBS/MP al 2 %. Posteriormente, el lavado se repitió 4 veces, seguido de la aplicación del segundo Ac conjugado a peroxidasa a una dilución 1:5000. La incubación fue también durante 1 hora. Finalmente, el lavado se repitió 4 veces, seguido de la aplicación del sustrato. La reacción con el desarrollo de color azul se interrumpió después de 5 min, utilizando ácido sulfúrico 0,5 M. El color amarillo resultante se midió fotométricamente a una longitud de onda de medición de 450 nm contra una longitud de onda de referencia de 620 nm, utilizando un lector de ELISA y se visualizó con la ayuda del programa informático Magellan. Cada solución se aplicó utilizando 100 µl por pocillo. Las etapas de bloqueo y de único lavado se llevaron a cabo utilizando 300 µl por pocillo cada vez. Las placas de microtitulación con péptido, suero de paciente y 2º Ac se incubaron con agitación a TA.

Protocolo de ELISA CDTGt, TGt:

Para detectar los anticuerpos específicos de TGt2 o de CDPTGt2, se desarrolló un ELISA específico en el que la TGt recombinante de la SEC ID Nº: 5 y CDTGt de la SEC ID Nº: 6 se acoplaron inicialmente a una placa de microtitulación MaxiSorb (Nunc), y posteriormente se utilizó el siguiente protocolo:

A) Tampón de acoplamiento: Tris 100 mM, NaCl 10 mM, pH 7,8

B) Tampón de lavado: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,4

C) Tampón de saturación: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,5 %, sacarosa al 3 %, pH 7,4

D) Tampón de dilución de suero: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,5 %, pH 7,4

Procedimiento:

Recubrimiento de placas MaxiSorb de Nunc: Cantidad de recubrimiento: CDPTGt y TGt se utilizaron cada una a una concentración de 0,5 µg/pocillo.

Volumen de recubrimiento: 100 µl/pocillo. Todas las TGt se diluyeron adecuadamente en tampón de acoplamiento A. Para el recubrimiento, las placas se incubaron a 40 °C durante una noche.

Los controles en blanco y de 2º Ac se llevaron a cabo a lo largo de la ejecución del ELISA. Los valores de DO de los controles en blanco y de 2º Ac se extrajeron en la evaluación del ELISA.

Después del recubrimiento las placas se lavaron 3 veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado B. Cada etapa de lavado se corresponde con 600 rpm en el agitador de ELISA durante 3 min. Posteriormente, las placas se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de saturación durante 2 h a TA. Los sueros se diluyeron 1:800 en tampón de dilución de suero D y después del bloqueo se colocaron directamente 100 µl/pocillo en las placas. Incubación a TA con agitación; 5 lavados de 300 µl /pocillo de tampón de lavado B.

2º Ac:

- se diluyó <IgAh>HRP de Dako 1:1500 en tampón de lavado B, y se utilizaron 100 µl/pocillo;
- así mismo, <IgGh>-HRP de Dako a una dilución de 1:5000 en tampón de lavado B, y se utilizaron 100 µl/pocillo.

Incubación durante 1 h a TA con agitación. 4 lavados con 300 µl/pocillo de tampón de lavado B. Se permite la reacción con 100 µl/pocillo de sustrato TMB (SeramunBlue fast) durante 5 min. Posteriormente, se desactiva con 100 µl/pocillo de sol. de desactivación (H_2SO_4 0,5 M) y se evalúa en lector de ELISA a 450 nm.

3. Cohorte de sueros de pacientes celíacos

En el curso del presente trabajo, se emplearon sueros de pacientes humanos de 91 pacientes con diagnóstico positivo para enfermedad celíaca, de edad, sexo y características patológicas variables. Todos los sueros utilizados se obtuvieron a partir del Department of Clinical Rheumatology at the Charité (Berlín). Además, como grupo control se procesaron 80 sueros de donantes normales, y se compararon con el grupo de enfermedades autoinmunitarias en este trabajo.

4. Comparación de las sensibilidades observadas para el ELISA de CD3, ELISA de TGt, ELISA de CDTGt y los ELISA de gliadina y TGt disponibles de forma comercial

Después, los sueros especificados en la Sección 3 se utilizaron en las pruebas de ELISA especificadas en la Sección 2. En paralelo, también se examinaron los mismos sueros con pruebas de ELISA para enfermedad celíaca disponibles de forma comercial que reaccionan a anticuerpos específicos de gliadina o a anticuerpos específicos de TGt2. Con tal fin, se utilizaron los ELISA comerciales de IgA o IgG anti TGth de Generic Assays GmbH (Alemania) y ELISA comerciales de IgA e IgG anti gliadina de Generic Assays GmbH (Alemania).

Como se muestra en la Fig. 1, se encontró que el ELISA específico para CD3 era más sensible en la clasificación correcta de los pacientes de enfermedad celíaca en comparación con los ELISA disponibles de forma comercial anti-TGt y anti-gliadina.

Así mismo, como se muestra en la Fig. 2, los ELISA basados en TG2t recombinante eran superiores, con respecto a la sensibilidad, a los ELISA anti TGt y anti gliadina disponibles de forma comercial. Con una gran diferencia, el ELISA basado en CDPTGt era el ELISA más sensible para la correcta clasificación de sueros de pacientes de enfermedad celíaca. Por lo tanto, en total, la presencia de la secuencia peptídica de la SEC ID Nº: 1 de acuerdo con la invención, da como resultado un ELISA de enfermedad celíaca con sensibilidad mejorada en comparación con los ELISA comerciales y un ELISA anti TGt llevado a cabo en las mismas condiciones que el ELISA de CDPTGt.

Por lo tanto, se ha demostrado que los péptidos que comprenden la secuencia peptídica de la SEC ID Nº: 1 de acuerdo con la invención, son informativos y pueden utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad celíaca. También, se ha demostrado que un ELISA basado en un péptido que comprende al péptido de acuerdo con la invención de la SEC ID Nº: 1 tiene sensibilidad mejorada.

La Fig. 3 ilustra los solapamientos de las sensibilidades del ELISA de CD3 con los ELISA disponibles de forma comercial anti gliadina y anti TGt .Se encontró que el ELISA de CD3 puede detectar sueros de pacientes celíacos que no se habían reconocido mediante una o más, o incluso ninguna de las pruebas de ELISA disponibles de forma comercial utilizadas. Por lo tanto, el uso de un ensayo de enfermedad celíaca basado en un péptido que comprende la secuencia peptídica de la SEC ID Nº: 1 proporciona una contribución valiosa a la detección serológica completa y el diagnóstico de pacientes de enfermedad celíaca.

5. Anticuerpos específicos de CD3 de sueros de pacientes

Purificación de afinidad de anticuerpos contra CD3

Para el aislamiento y la purificación de anticuerpos específicos de afinidad contra el péptido CD3 de sueros de pacientes, la variante del péptido CD3 biotinilada se acopló a placas de microtitulación de avidina o neutravidina, seguido de la utilización de un grupo de 24 sueros de celíacos fuertemente positivos, con unión de fondo no específica menor, para la formación de complejos inmunes. De forma inicial, la placa de microtitulación (PMT) se bloqueó con PBST/MP al 5 % durante 1 h a TA. Esto se siguió de 3 lavados con tampón de lavado PBS, y los pocillos de la placa de 96 pocillos se recubrieron con 5000 pmol/pocillo de péptido CD3, que corresponde a una capacidad de 10 veces por pocillo. Después de la incubación a TA durante 1 hora, la placa se lavó 3 veces con

tampón de lavado. Posteriormente, los sueros se aplicaron a la placa de estreptavidina o a la placa de neutravidina, para lo cual cada suero de paciente se diluyó inicialmente 1:100 en PBST/MP al 2 %. Posteriormente, se agruparon los sueros y se colocaron en los pocillos utilizando un volumen de 100 µl/pocillo. Esto se siguió de incubación durante 1 hora a TA. Posteriormente, los contenidos de todos los pocillos se retiraron y se recombinaron, y se utilizaron en otro ciclo de purificación o como un control para la purificación específica de afinidad efectuada en otro ciclo de purificación con el péptido de control negativo, en este caso Bor21. Después de retirar los sueros, la placa se lavó 4 veces con tampón de lavado. Posteriormente, se agregaron a los pocillos 150 µl/pocillo de tampón de elución glicina, y se incubaron en el agitador durante 10 min.

Finalmente, el tampón de elución se resuspendió varias veces y se retiró de los pocillos, e inmediatamente se combinó con tampón Tris-HCl 1 M pH 8,0 1:10. Esto se siguió de forma inmediata del retamponado mediante ultracentrifugación en AmiconFalcons con un límite de membrana de 55 kDa, utilizando 5 veces de un volumen de 5 veces de tampón PBS como tampón de equilibrio. Como control de buen desempeño, el lote se analizó en el ELISA de CD3 con sueros de control positivo y negativo. Las cantidades de anticuerpos así obtenidas se reservaron a 4 ºC en PBS y se utilizaron en pruebas inmunológicas adicionales.

Todas las etapas de lavado se realizaron utilizando un volumen de 300 µl/pocillo. Además, todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a TA en el agitador de placas de ELISA, a una velocidad de rotación de 600 rpm.

Como se muestra en la Fig. 4, los anticuerpos del péptido CD3 así aislados reaccionan de forma específica con CDPTGt en un experimento de transferencia Western. De aquí se desprende que el antígeno en el péptido CD3 no es un antígeno conformacional, pero se puede detectar también en estado desnaturalizado mediante anticuerpos de péptido CD3 aislados de sueros de pacientes. En consecuencia, los péptidos que comprenden al péptido de acuerdo con la invención de la SEC ID Nº: 1 no solo son adecuados para su uso en pruebas de diagnóstico que se enfocan en antígenos en estado natural, sino también para formatos de pruebas en las que el antígeno se utiliza en estado desnaturalizado, tal como ensayos de transferencia Western, matrices de proteínas, matrices de esferas Luminex, y/o ensayos de chips de proteínas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Charite - Universitatsmedizin Berlin

<120> Nuevos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad celíaca

<130> P680209DE

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 24
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido artificial

<400> 1

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

Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu
            20
```

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido artificial

<400> 2

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

Pro Phe Gln Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe
            20                  25                  30
```

<210> 3
<211> 31
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido artificial

<400> 3

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

Pro Phe Gln Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Lys
            20                  25                  30
```

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido artificial

<220>
<221> UNIÓN
<222> (31)..(31)
<223> Lys está biotinilada

<400> 4

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

Pro Phe Gln Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Lys
            20                  25                  30
```

<210> 5
<211> 687
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Ala Glu Glu Leu Val Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Leu Glu Thr
1 5 10 15

Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Arg Glu Lys Leu Val
20 25 30

Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu Thr Leu His Phe Glu Gly Arg
35 40 45

Asn Tyr Glu Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Ser Val Val Thr Gly
50 55 60

Pro Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Pro Leu Arg
65 70 75 80

Asp Ala Val Glu Glu Gly Asp Trp Thr Ala Thr Val Val Asp Gln Gln
85 90 95

Asp Cys Thr Leu Ser Leu Gln Leu Thr Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
100 105 110

Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125

Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Phe Asn Ala Trp Cys Pro

130 135 140

Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu Tyr Val
145 150 155 160

Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe Ile Lys
165 170 175

Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Ile
180 185 190

Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Ala Gly
195 200 205

Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg Val Val
210 215 220

Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240

Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp Ile Gly
245 250 255

Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln Arg Val
260 265 270

Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
275 280 285

Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
290 295 300

His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
305 310 315 320

Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
325 330 335

Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
340 345 350

Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
355 360 365

Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
370 375 380

Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
385 390 395 400

Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys Ser Ile
405 410 415

Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
420 425 430

Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
435 440 445

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
450 455 460

Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
465 470 475 480

Gln Ser Met Asn Met Gly Ser Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Thr
485 490 495

Asn Asn Thr Ala Glu Glu Tyr Val Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
500 505 510

Thr Val Ser Tyr Asn Gly Ile Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Lys Tyr
515 520 525

Leu Leu Asn Leu Asn Leu Glu Pro Phe Ser Glu Lys Ser Val Pro Leu
530 535 540

Cys Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Arg Asp Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu
545 550 555 560

Ile Lys Val Arg Ala Leu Leu Val Glu Pro Val Ile Asn Ser Tyr Leu
565 570 575

Leu Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg
580 585 590

Ile Leu Gly Glu Pro Lys Gln Lys Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser
595 600 605

Leu Gln Asn Pro Leu Pro Val Ala Leu Glu Gly Cys Thr Phe Thr Val
610 615 620

Glu Gly Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Thr Val Glu Ile Pro Asp
625 630 635 640

Pro Val Glu Ala Gly Glu Glu Val Lys Val Arg Met Asp Leu Leu Pro
645 650 655

Leu His Met Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Ser Asp Lys
660 665 670

Leu Lys Ala Val Lys Gly Phe Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala
675 680 685

<210> 6
<211> 717
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> artificial

<400> 6

Met Ala Glu Glu Leu Val Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Leu Glu Thr
1 5 10 15

Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Arg Glu Lys Leu Val
20 25 30

Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu Thr Leu His Phe Glu Gly Arg
35 40 45

Asn Tyr Glu Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Ser Val Val Thr Gly
50 55 60

Pro Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Pro Leu Arg
65 70 75 80

Asp Ala Val Glu Glu Gly Asp Trp Thr Ala Thr Val Val Asp Gln Gln
85 90 95

Asp Cys Thr Leu Ser Leu Gln Leu Thr Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
100 105 110

Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125

Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Phe Asn Ala Trp Cys Pro
130 135 140

Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu Tyr Val
145 150 155 160

Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe Ile Lys
165 170 175

Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Ile
180 185 190

Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Ala Gly
195 200 205

Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg Val Val
210 215 220

Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240

Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp Ile Gly
245 250 255

Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln Arg Val
260 265 270

Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
275 280 285

Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
290 295 300

His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
305 310 315 320

Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
325 330 335

Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
340 345 350

Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
355 360 365

Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
370 375 380

Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
385 390 395 400

Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys Ser Ile
405 410 415

Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
420 425 430

Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
435 440 445

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
450 455 460

Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
465 470 475 480

Gln Ser Met Asn Met Gly Ser Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Thr
485 490 495

Asn Asn Thr Ala Glu Glu Tyr Val Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
500 505 510

Thr Val Ser Tyr Asn Gly Ile Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Lys Tyr
515 520 525

Leu Leu Asn Leu Asn Leu Glu Pro Phe Ser Glu Lys Ser Val Pro Leu
530 535 540

Cys Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Arg Asp Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu
545 550 555 560

Ile Lys Val Arg Ala Leu Leu Val Glu Pro Val Ile Asn Ser Tyr Leu
565 570 575

Leu Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg
580 585 590

Ile Leu Gly Glu Pro Lys Gln Lys Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser
595 600 605

Leu Gln Asn Pro Leu Pro Val Ala Leu Glu Gly Cys Thr Phe Thr Val
610 615 620

Glu Gly Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Thr Val Glu Ile Pro Asp
625 630 635 640

Pro Val Glu Ala Gly Glu Glu Val Lys Val Arg Met Asp Leu Leu Pro
645 650 655

Leu His Met Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Ser Asp Lys
660 665 670

Leu Lys Ala Val Lys Gly Phe Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala Gln
675 680 685

Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Gln Pro Glu Gln Pro
690 695 700

Phe Gln Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe
705 710 715

<210> 7
<211> 747
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> artificial

<400> 7

Met Ala Glu Glu Leu Val Leu Glu Arg Cys Asp Leu Glu Leu Glu Thr
1 5 10 15

Asn Gly Arg Asp His His Thr Ala Asp Leu Cys Arg Glu Lys Leu Val
20 25 30

Val Arg Arg Gly Gln Pro Phe Trp Leu Thr Leu His Phe Glu Gly Arg
35 40 45

Asn Tyr Glu Ala Ser Val Asp Ser Leu Thr Phe Ser Val Val Thr Gly
50 55 60

Pro Ala Pro Ser Gln Glu Ala Gly Thr Lys Ala Arg Phe Pro Leu Arg
65 70 75 80

Asp Ala Val Glu Glu Gly Asp Trp Thr Ala Thr Val Val Asp Gln Gln
85 90 95

Asp Cys Thr Leu Ser Leu Gln Leu Thr Thr Pro Ala Asn Ala Pro Ile
100 105 110

Gly Leu Tyr Arg Leu Ser Leu Glu Ala Ser Thr Gly Tyr Gln Gly Ser
115 120 125

Ser Phe Val Leu Gly His Phe Ile Leu Leu Phe Asn Ala Trp Cys Pro
130 135 140

Ala Asp Ala Val Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Glu Arg Gln Glu Tyr Val
145 150 155 160

Leu Thr Gln Gln Gly Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Ala Lys Phe Ile Lys
165 170 175

Asn Ile Pro Trp Asn Phe Gly Gln Phe Glu Asp Gly Ile Leu Asp Ile
180 185 190

Cys Leu Ile Leu Leu Asp Val Asn Pro Lys Phe Leu Lys Asn Ala Gly
195 200 205

Arg Asp Cys Ser Arg Arg Ser Ser Pro Val Tyr Val Gly Arg Val Val
210 215 220

Ser Gly Met Val Asn Cys Asn Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gly Arg
225 230 235 240

Trp Asp Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Val Ser Pro Met Ser Trp Ile Gly
245 250 255

Ser Val Asp Ile Leu Arg Arg Trp Lys Asn His Gly Cys Gln Arg Val
260 265 270

Lys Tyr Gly Gln Cys Trp Val Phe Ala Ala Val Ala Cys Thr Val Leu
275 280 285

Arg Cys Leu Gly Ile Pro Thr Arg Val Val Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
290 295 300

His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu Phe
305 310 315 320

Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile Trp Asn Phe His Cys
325 330 335

Trp Val Glu Ser Trp Met Thr Arg Pro Asp Leu Gln Pro Gly Tyr Glu
340 345 350

Gly Trp Gln Ala Leu Asp Pro Thr Pro Gln Glu Lys Ser Glu Gly Thr
355 360 365

Tyr Cys Cys Gly Pro Val Pro Val Arg Ala Ile Lys Glu Gly Asp Leu
370 375 380

Ser Thr Lys Tyr Asp Ala Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asp
385 390 395 400

Val Val Asp Trp Ile Gln Gln Asp Asp Gly Ser Val His Lys Ser Ile
405 410 415

Asn Arg Ser Leu Ile Val Gly Leu Lys Ile Ser Thr Lys Ser Val Gly
420 425 430

Arg Asp Glu Arg Glu Asp Ile Thr His Thr Tyr Lys Tyr Pro Glu Gly
435 440 445

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Ala Phe Thr Arg Ala Asn His Leu Asn Lys
450 455 460

Leu Ala Glu Lys Glu Glu Thr Gly Met Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
465 470 475 480

Gln Ser Met Asn Met Gly Ser Asp Phe Asp Val Phe Ala His Ile Thr
485 490 495

Asn Asn Thr Ala Glu Glu Tyr Val Cys Arg Leu Leu Leu Cys Ala Arg
500 505 510

Thr Val Ser Tyr Asn Gly Ile Leu Gly Pro Glu Cys Gly Thr Lys Tyr
515 520 525

Leu Leu Asn Leu Asn Leu Glu Pro Phe Ser Glu Lys Ser Val Pro Leu
530 535 540

Cys Ile Leu Tyr Glu Lys Tyr Arg Asp Cys Leu Thr Glu Ser Asn Leu
545 550 555 560

Ile Lys Val Arg Ala Leu Leu Val Glu Pro Val Ile Asn Ser Tyr Leu
565 570 575

Leu Ala Glu Arg Asp Leu Tyr Leu Glu Asn Pro Glu Ile Lys Ile Arg
580 585 590

Ile Leu Gly Glu Pro Lys Gln Lys Arg Lys Leu Val Ala Glu Val Ser
595 600 605

Leu Gln Asn Pro Leu Pro Val Ala Leu Glu Gly Cys Thr Phe Thr Val
610 615 620

Glu Gly Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Thr Val Glu Ile Pro Asp
625 630 635 640

Pro Val Glu Ala Gly Glu Glu Val Lys Val Arg Met Asp Leu Leu Pro
645 650 655

Leu His Met Gly Leu His Lys Leu Val Val Asn Phe Glu Ser Asp Lys
660 665 670

Leu Lys Ala Val Lys Gly Phe Arg Asn Val Ile Ile Gly Pro Ala Gln
675 680 685

Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Gln Pro Glu Gln Pro
690 695 700

Phe Gln Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Gln Glu Gln
705 710 715 720

Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Gln Pro Glu Gln Pro Phe Gln

725 730 735

Glu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe
740 745

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que contiene o que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 2, 3 o 4.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el péptido tiene aminoácidos adicionales, uno o más enlazadores y/o uno o más grupos funcionales.

3. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el péptido comprende adicionalmente una secuencia de al menos 25 aminoácidos consecutivos de la secuencia de TGt2 humano de la SEC ID Nº: 5.

4. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el péptido contiene o consiste en una secuencia de las SEC ID Nº: 6 o 7.

5. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.

6. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en diagnóstico.

7. Un método para la detección *in vitro* en una muestra de anticuerpos contra un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que**:

i) un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se pone en contacto con una muestra *in vitro*, y
ii) se detecta anticuerpo unido al péptido.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la muestra se obtiene a partir de un líquido corporal o implica un líquido corporal.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, **caracterizado por que** el péptido está inmovilizado en un soporte.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** el método se lleva a cabo en un formato de ELISA.

11. Un kit para realizar un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, incluyendo dicho kit un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 inmovilizado en un soporte.

12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por que** el kit está en la forma de un ELISA o tira reactiva.

13. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizado por que** el kit adicionalmente incluye agentes para la detección de anticuerpos de tipo IgA y/o IgG.

14. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para diagnóstico.

15. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

16. Un microorganismo transformado o una célula transfectada que comprenden un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15.

17. Un anticuerpo aislado que se une a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº: 2 o 3.

18. Uso de anticuerpos aislados de acuerdo con la reivindicación 17 para la detección de patógenos asociados a la enfermedad celíaca.

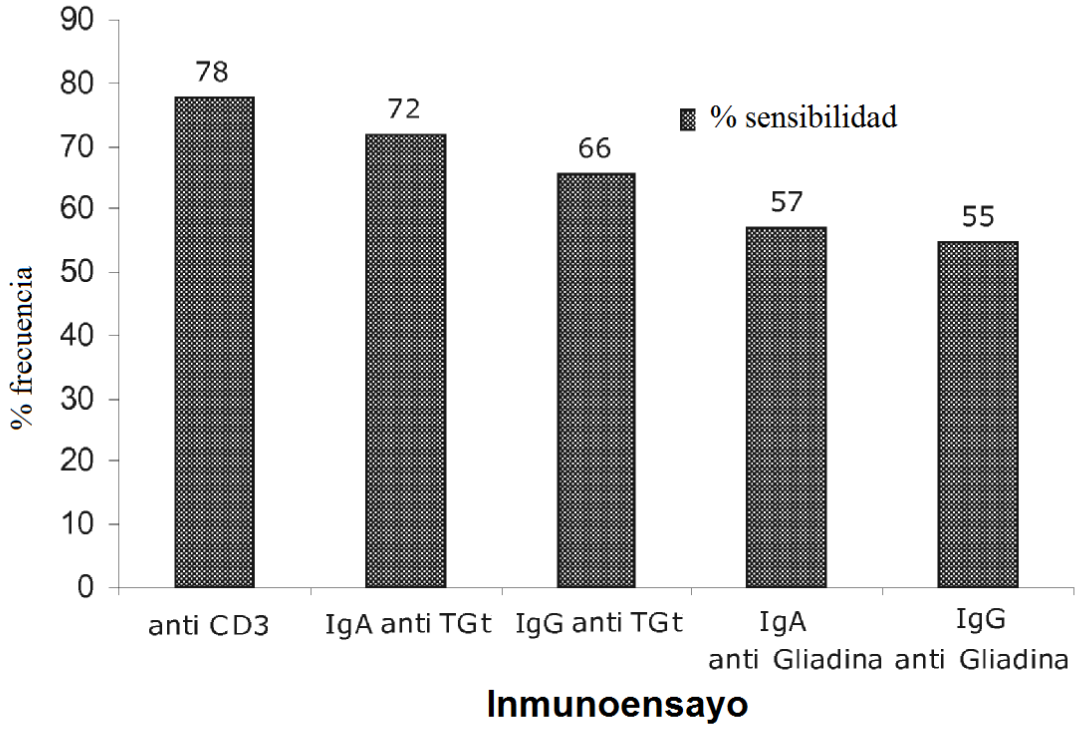
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% frecuencia
78
72
66
57
55
% sensibilidad
anti CD3
IgA anti TGt
IgG anti TGt
IgA anti Gliadina
IgG anti Gliadina
Inmunoensayo

FIG. 1

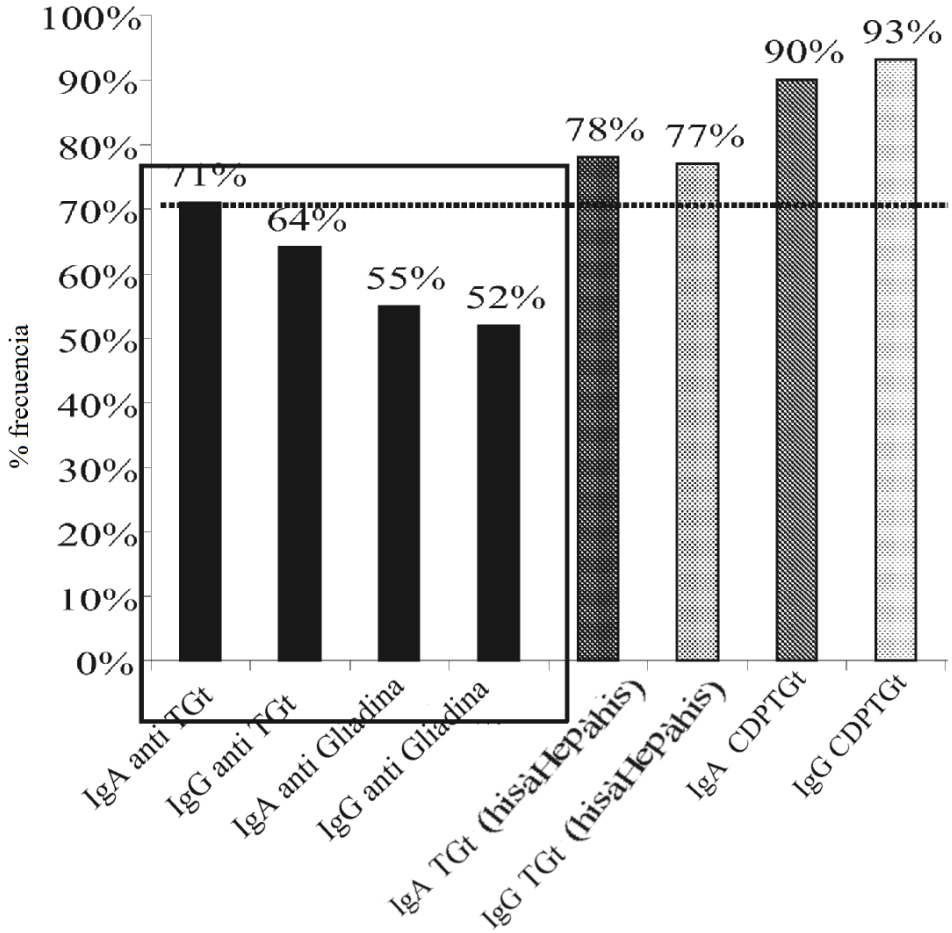
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
% frecuencia
71%
64%
55%
52%
78%
77%
90%
93%
IgA anti TGt
IgG anti TGt
IgA anti Gliadina
IgG anti Gliadina
IgA TGt (hisàHepàhis)
IgG TGt (hisàHepàhis)
IgA CDPTGt
IgG CDPTGt

Fig. 2

características negativas	**Número de sueros negativos**	**sueros positivos por ensayo [%]**				
		IgA TGt	**IgG TGt**	**IgA Gliadina**	**IgG Gliadina**	**Péptido CDP**
IgA TGt negativo	26	(n.e.4)	**46**	15	**46**	**46**
IgG TGt negativo	31	**55**	(n.e.4)	39	29	52
IgA Gliadina negativo	38	42	50	(n.e.4)	42	**55**
IgG Gliadina negativo	41	66	49	46	(n.e.4)	**71**
CDP negativo	20	30	25	20	**40**	(n.e.4)
IgA/IgG TGt negativo	14	(n.e.4)	(n.e.4)	21	**36**	29
IgA/IgG Gliadina negativo	22	55	41	(n.e.4)	(n.e.4)	**64**
IgA TGt; IgA Gliadina negativo	22	(n.e.4)	50	(n.e.4)	**55**	46
IgA TGt; IgG Gliadina negativo	14	(n.e.4)	50	29	(n.e.4)	50
IgG TGt; IgA Gliadina negativo	19	**42**	(n.e.4)	(n.e.4)	32	37
IgG TGt; IgG Gliadina negativo	22	**59**	(n.e.4)	45	(n.e.4)	50
IgA/IgG TGt; IgA Gliadina negativo	11	(n.e.4)	(n.e.4)	(n.e.4)	**45**	27
IgA/IgG TGt; IgG Gliadina negativo	9	(n.e.4)	(n.e.4)	**33**	(n.e.4)	**33**
IgA/IgG Gliadina; IgA TGt negativo	10	(n.e.4)	40	(n.e.4)	(n.e.4)	**50**
IgA/IgG Gliadina; IgG TGt negativo	12	**50**	(n.e.4)	(n.e.4)	(n.e.4)	42
TGt; Gliadina negativo	6	(n.e.4)	(n.e.4)	(n.e.4)	(n.e.4)	30

Fig. 3

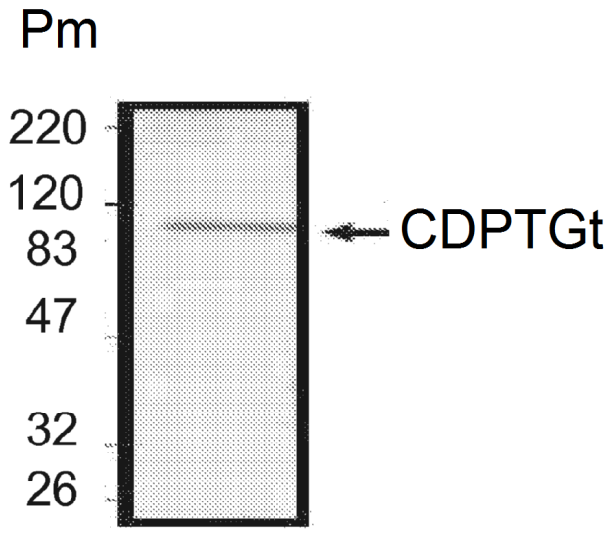

Fig. 4