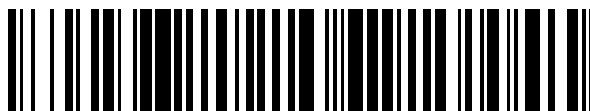


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 628**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2010 PCT/EP2010/006983**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11057826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 10781835 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2462439**

54 Título: **Transglutaminasa de forma abierta estabilizada como indicador diagnóstico para enfermedades auto-inmunes**

30 Prioridad:

11.11.2009 EP 09014100
02.12.2009 US 282008 P
23.07.2010 EP 10007682

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

ZEDIRA GMBH (100.0%)
Rösslerstrasse 83
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

HILS, MARTIN;
PASTERNAK, RALF y
WEBER, JOHANNES

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 602 628 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).

Transglutaminasa de forma abierta estabilizada como indicador diagnóstico para enfermedades auto-inmunes

Descripción

[0001] La presente invención se refiere al diagnóstico de trastornos o disfunciones caracterizadas por respuestas autoinmunes a la clase de la enzima de transglutaminasas. La presente invención proporciona una estructura abierta novedosa de los transglutaminasas en una forma estabilizada que hace que nuevos epítomos sean accesibles para la unión de anticuerpos.

Antecedentes de la invención

[0002] Las transglutaminasas (TG) son enzimas que existen en los vertebrados superiores, incluyendo el cuerpo humano como una familia de nueve miembros, incluida la banda inactiva de proteína estructural 4,2. Cumplen una gran variedad de funciones fisiológicas, por ejemplo, en la coagulación, inflamación, diferenciación celular, apoptosis, célula-célula e interacciones célula-matriz, y la curación de la herida. En presencia de transglutaminasas de Ca^{2+} puede desarrollar su actividad catalítica, la formación de enlaces γ -glutamil- ϵ -lisina inter e intra-moleculares, también llamados enlaces iso-péptidos, entre las cadenas laterales de glutamina y lisina peptídicas. En general, los resultados de esta actividad son los agregados de alto peso molecular de la proteína de peso. Las transglutaminasas 1, 3 y 5 se utilizan principalmente en la formación de piel, factor XIII (plasma-transglutaminasa) es activo en la coagulación de la sangre y la curación de heridas, la transglutaminasa 6 principalmente se ha encontrado en tejidos neuronales y transglutaminasa 4 en el líquido del semen. Transglutaminasa 2 (transglutaminasa tisular, TG2) está presente ubicuamente en diversos tejidos. Además de su actividad de reticulación, TG2 también puede desamidar el grupo de carboxiamida de glutamina peptídica, especialmente en condiciones ligeramente ácidas, así como en ausencia de lisina u otras aminas primarias. Como el producto de desamidación es un grupo carboxilo, una carga negativa se introduce en el péptido que resulta en un cambio significativo de las propiedades del péptido. Además TG2 tiene actividad y las funciones de GTP-hidrolizante como una G-proteína. Incluso se describe la actividad de quinasa. TG2 desempeña un papel en varias enfermedades como la enfermedad celíaca, fibrosis, cáncer, y trastornos neurológicos.

[0003] En la enfermedad celíaca, una inflamación crónica del intestino delgado y una enfermedad autoinmune, TG2 juega un papel multifuncional. La digestión de las proteínas presentes en los alimentos se lleva a cabo por escisión proteolítica a los aminoácidos y pequeños péptidos, que pueden ser reabsorbidos por la mucosa intestinal. Proteínas de cereales como gluten muestran un alto contenido de la prolina de aminoácidos. Pero las enzimas responsables de la degradación de proteínas en el tracto digestivo no son capaces de hidrolizar las proteínas ricas en prolina en aminoácidos y pequeños péptidos. En consecuencia los péptidos más bien largos, como los péptidos de gliadina están presentes en la mucosa. Debido a su tamaño no pueden ser reabsorbidos, pero todavía son capaces de pasar el epitelio y llegar a la llamada lámina propia, un tejido de conexión entre el epitelio y el tejido muscular. En la lámina propia extracelular TG2 está presente. Ahora un paso esencial en la fisiopatología de la enfermedad celíaca se lleva a cabo: TG2 desamida péptidos de gliadina. En su forma desamidada, péptidos de gliadina son reconocidos por los receptores HLA-DQ2 y HLA-DQ8 de células inmunes. Este reconocimiento conduce a la activación de la respuesta inflamatoria que en la etapa final de la enfermedad se manifiesta en una atrofia de las vellosidades completas de la mucosa intestinal. TG2 no sólo cataliza la desamidación de gliadina, que sirve también como autoantígeno en la enfermedad celíaca. Los pacientes que sufren de la enfermedad celíaca desarrollan autoanticuerpos contra TG2. Si los pacientes siguen con éxito una dieta libre de gluten estricta, títulos de anti-TG2-autoanticuerpos disminuyen. Por lo tanto TG2 no sólo se utiliza como antígeno para la detección de autoanticuerpos en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, sino también en el seguimiento y control de la dieta libre de gluten. TG2-autoanticuerpos también se encuentran en otras enfermedades como la diabetes tipo 1 o la psoriasis y por lo tanto se pueden usar también en el diagnóstico de enfermedades no celíacas.

[0004] Es interesante que en otras indicaciones en desarrollo a lo largo o en consecuencia a la enfermedad celíaca, más autoanticuerpos contra transglutaminasas se pueden encontrar: Dermatitis herpetiforme, un trastorno de la piel sensible al gluten se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra transglutaminasa epidérmica (TG3) mientras que en autoanticuerpos de ataxia sensibles al gluten se han encontrado anticuerpos contra transglutaminasa neuronal (TG6).

[0005] Objetivo de la presente invención es proporcionar un método más sensible para la detección de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos específicos de transglutaminasa.

[0006] El objetivo de la presente invención se resuelve mediante la enseñanza de las reivindicaciones independientes. Otras características ventajosas, aspectos y detalles de la invención quedarán evidentes de las reivindicaciones dependientes, de la descripción, las figuras y los ejemplos de la presente solicitud.

Descripción de la invención

[0007] La presente invención encontró, sorprendentemente, que el uso de la transglutaminasa de forma abierta para

la detección de autoanticuerpos conduce a títulos más altos en comparación con la forma cerrada de la transglutaminasa y revela títulos positivos en pacientes con títulos contra la forma TG cerrada por debajo de la interrupción. Esta invención es de gran impacto en el diagnóstico, el aislamiento y caracterización de anticuerpos de las células inmunes.

5 **[0008]** Las transglutaminasas cambian su estructura terciaria tras la unión del sustrato. TG de sustrato no vinculante inactivo muestra una forma cerrada que se cambia a una forma abierta en los cambios de unión a sustratos. Ambos forman la forma cerrada y sin sustrato y la forma abierta con el sustrato se reconocen por autoanticuerpos. Se supone que existen autoanticuerpos para la forma cerrada, así como para la forma abierta.

10 **[0009]** Sin embargo, lo más sorprendente que se constató era que la forma abierta de la TG se podía utilizar para detectar autoanticuerpos en una sensibilidad mucho mayor en comparación con la forma cerrada. En consecuencia, los métodos más sensibles y precisos para la detección de autoanticuerpos contra la forma abierta de la TG se desarrollaron y son objeto de la presente invención con el fin de detectar de una manera mucho más precisa y diagnosticar enfermedades asociadas con la presencia de autoanticuerpos para la forma abierta de
15 transglutaminasa.

[0010] Así, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de un trastorno autoinmune, donde la forma de transglutaminasa abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta se utilizan para la detección de la presencia de autoanticuerpos específicos para la forma abierta de
20 transglutaminasa o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta, donde fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta son péptidos después de la reacción con un inhibidor que comprende una cadena principal, una cadena principal de péptido o un esqueleto peptidomimético y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente al grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la respectiva transglutaminasa y los fragmentos antigénicamente activos tienen una disposición de residuos de
25 aminoácidos que forman parte de la superficie de la transglutaminasa de forma abierta expuesta a la activación de la enzima y donde los fragmentos antigénicamente activos son capaces de provocar una respuesta de anticuerpos contra epítopos, que sólo son accesibles para los anticuerpos después de la unión de un inhibidor.

[0011] La forma abierta de la transglutaminasa o un fragmento de la forma abierta de una transglutaminasa que tiene una actividad comparable a la forma de transglutaminasa abierta, por tanto, un fragmento antigénicamente activo de esta forma de transglutaminasa abierta se genera por reacción de la transglutaminasa o el fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa con un inhibidor que comprende una cadena principal, una cadena principal de péptido o un esqueleto peptidomimético y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente con el grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la TG. El inhibidor también puede reaccionar con otras
30 cisteínas que no se encuentran en el lado activo de la TG pero el inhibidor debe ser capaz de reaccionar con la cisteína en el sitio activo de la respectiva TG. Con el fin de hacer que el inhibidor sea más regioselectivo, el grupo reactivo de tiol del inhibidor se une preferiblemente a un esqueleto, un esqueleto peptídico o columna principal peptidomimético o cualquier espina dorsal sintética que tiene afinidad por el sitio activo para aumentar la regioselectividad de la molécula de inhibidor. Con el fin de generar la forma abierta de una TG que es importante para que el inhibidor se una covalentemente al grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la TG. En consecuencia, se prefieren inhibidores que tengan un esqueleto unido a un grupo reactivo de tiol que tenga cierta similitud con los sustratos naturales de la TG. Tales cadenas principales son preferiblemente cadenas principales similares a péptidos, es decir, cadenas principales que comprendan enlaces amida y al menos una cadena de carbono unido al grupo carbonilo del enlace amida o al menos un átomo de carbono opcionalmente sustituido entre
40 dos enlaces de amida.
45

[0012] El trastorno autoinmune se puede seleccionar de entre el grupo que comprende o que consiste en enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, polimiositis, colitis ulcerativa, trastorno de sensibilidad a las proteínas de cereales, trastornos sensibles al gluten, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, Morbus Dühring, diabetes mellitus tipo 1, epilepsia, dolor de cabeza con anomalías de sustancia blanca, síndrome de persona rígida, neuropatía motora subaguda y neuropatía sensorial subaguda.

[0013] Preferiblemente, el trastorno autoinmune se puede seleccionar de entre el grupo que comprende o que consiste en la enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, enfermedad de Addison; hepatitis autoinmune; polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; Tiroiditis de Hashimoto; esclerosis múltiple; polimiositis; colitis ulcerosa; la diabetes mellitus tipo 1; epilepsia; y neuropatía, especialmente neuropatía sensible a gluten, ataxia sensible a gluten; ataxia idiopática esporádica y la ataxia de gluten con enteropatía.

60 **[0014]** La presente invención es más útil para el diagnóstico de trastornos sensibles al gluten, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme y ataxia sensible al gluten.

[0015] En otras palabras, la presente invención se refiere a un método *in vivo* para el diagnóstico de un trastorno autoinmune, en el que al menos una forma de transglutaminasa abierta o al menos un fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa abierta se utiliza para la detección de la presencia de autoanticuerpos específicos para la forma de transglutaminasa abierta o específicos para el fragmento antigénicamente activo de la
65

transglutaminasa truncada resultante se inhibe entonces con el fin de convertirlo en su conformación abierta. En caso de que la transglutaminasa truncada no muestra actividad enzimática adicional, un fuerte inhibidor SH-reactivo se puede utilizar con el fin de convertir la proteína en su conformación abierta. Un método adicional para la generación de fragmentos antigénicamente activos es el uso de un péptido sintético que abarca la secuencia alrededor de la cisteína del sitio activo, donde un inhibidor es añadido por métodos químicos para la cisteína del sitio activo. Finalmente la transglutaminasa de conformación abierta se puede tratar con proteasas con el fin de crear fragmentos antigénicamente activos, que se pueden separar por métodos cromatográficos conocidos por expertos en la técnica.

[0022] Los métodos de la presente invención también se pueden realizar utilizando más de una transglutaminasa de forma abierta o inhibida y/o más de un fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa abierta al mismo tiempo dentro del método. Por lo tanto, las mezclas de transglutaminasas (TGS) se pueden utilizar dentro de los métodos de la invención. Además, la detección de, por ejemplo, autoanticuerpos de transglutaminasa 2 o autoanticuerpos de transglutaminasa 3 o autoanticuerpos de transglutaminasa 6 se puede combinar con la detección de autoanticuerpos a uno o más isoformas de transglutaminasa como TG1, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7 o factor de coagulación XIII.

[0023] A continuación, la invención se describe en detalle en lo que respecta a la transglutaminasa 2 (TG2), mientras que la invención se puede realizar con todos los otros TGs de una manera similar. Sin embargo TG2, TG3 y TG6 son las transglutaminasas preferidas. Por lo tanto, la presente invención no se limita a la utilización de TG2. TG2 sólo se utiliza como ejemplo representativo de todas las TG para descripción de la presente invención en detalle.

[0024] La transglutaminasa 2 cambia su estructura terciaria tras la unión del sustrato. Considerando que TG2 inactiva unida a sustrato muestra una forma en forma de bola más cerrada, los dos β -dominios vuelven tras la unión de sustrato que resulta en una forma más longitudinal como se muestra en la figura 1. Este cambio en la estructura terciaria es una característica común de todas las transglutaminasas vertebradas. Por lo tanto nuevos epítomos, que han sido cubiertos o enmascarados en forma cerrada, son ahora accesibles.

[0025] Por ejemplo, la transglutaminasa tisular (TG2) es el autoantígeno en la enfermedad celíaca. La enfermedad se caracteriza por un título elevado de autoanticuerpos contra TG2 (IgA e IgG). A pesar de que sufre de la enfermedad celíaca, algunos pacientes muestran títulos de anticuerpos muy bajos o inexistentes. En un grupo de pacientes, el título IgA que falta se puede explicar por una deficiencia general IgA. Pero sigue habiendo pacientes con enfermedad celíaca con una enfermedad celíaca probada por biopsia (atrofia de las vellosidades intestinales) y sin deficiencia IgA, sino una serología de autoanticuerpos TG2 negativa o dudosa.

[0026] Por lo tanto, las enfermedades descritas en el presente documento se pueden detectar con más precisión mediante el uso de la TG de forma abierta para la detección de autoanticuerpos contra o específicamente contra dicha TG de forma abierta.

[0027] La forma abierta de la transglutaminasa está presente en el momento de unirse a un sustrato a la TG. La TG está en una forma cerrada cuando ningún sustrato esté unido. Con el fin de obtener la TG en su forma abierta, se añade un sustrato o un inhibidor de la TG. Puesto que es ventajoso obtener una TG estabilizada en su forma abierta, inhibidores e inhibidores irreversibles se utilizan preferiblemente que reaccionan con las TG. En consecuencia, con el fin de obtener el fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa abierta, el fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa de forma abierta se hace reaccionar con un inhibidor y, preferiblemente, un inhibidor irreversible con el fin de estabilizar la forma abierta del fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa de forma abierta.

[0028] Tal como se utiliza aquí, el término "inhibidor irreversible" se refiere a un inhibidor que se une covalentemente a la TG o que se une lo suficientemente bien para que no existiera equilibrio. Los inhibidores irreversibles son más a menudo inhibidores con al menos un grupo funcional que es capaz de formar un enlace covalente a la diana tal como una TG de modo que se requiere un inhibidor para inactivar una enzima TG y por consiguiente estabilizar la forma abierta de la TG.

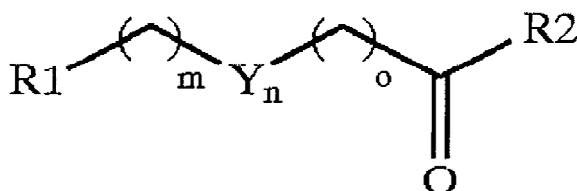
[0029] Por tanto, el término "transglutaminasa de forma abierta" o "transglutaminasa inhibida" tal como se utiliza en este documento también se puede referir a transglutaminasas con nuevos epítomos, que sólo son accesibles para los anticuerpos después de la unión de un inhibidor. El método de la invención utiliza transglutaminasas que permite la detección de nuevos auto-anticuerpos que no son detectados sin la unión de un inhibidor. Por lo tanto la forma inventiva de transglutaminasas tiene epítomos de reciente acceso, que permite la detección de nuevos autoanticuerpos.

Los términos "transglutaminasa de forma abierta" y "transglutaminasa abierta" y "transglutaminasa inhibida" y "transglutaminasa conformacionalmente modificada" se usa en el presente documento como sinónimos. Estos términos se refieren a una transglutaminasa como TG2, TG3, TG6 que cambian su conformación al unirse un inhibidor o un sustrato de manera que existen dos transglutaminasas conformacionalmente distintas que son reconocidas por dos clases de anticuerpos. Los anticuerpos para la forma abierta (o inhibidos o

conformacionalmente cambiados de) muy probablemente no reconocen la forma cerrada. Ambos tipos de anticuerpos se pueden detectar con el fin de diagnosticar trastornos autoinmunes caracterizados por la presencia de autoanticuerpos contra las dos formas diferentes (abiertas/cerradas o, respectivamente, no inhibidas/inhibidas o conformacionalmente no cambiadas/conformacionalmente cambiadas) de la respectiva transglutaminasa.

El término "conformacionalmente modificado" se refiere a la conformación modificada de la transglutaminasa respectiva cuando un sustrato o un inhibidor y, especialmente, uno de los inhibidores descritos en este documento está unido al sitio activo de la transglutaminasa. La forma cerrada o forma no inhibida o forma conformacionalmente no cambiada de transglutaminasa se pueden distinguir de la forma abierta o forma inhibida o forma conformacionalmente modificada por la presencia de otro tipo de autoanticuerpos dirigidos a dicha forma abierta, inhibida o conformacionalmente cambiada. Por lo tanto, la presencia de otro tipo de autoanticuerpos dirigidos a una transglutaminasa como TG2 o TG3 o TG6 indica que existe la forma abierta, inhibida o conformacionalmente cambiada de dicha transglutaminasa.

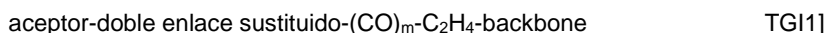
[0030] Los inhibidores basados en proteínas, por ejemplo proteínas de la matriz extracelular, proteínas de plasma o proteínas de alimentos, y las porciones dipéptidicas o más grandes de los mismos, así como inhibidores que comprenden una cadena principal de tipo péptido, columna principal peptidomimética o cualquier otra columna principal que tiene afinidad por el sitio activo de la TG o que tiene similitud con la columna principal del sustrato natural en lo que se refiere a la longitud, el número de átomos, la estructura terciaria, el peso molecular, los grupos funcionales y/o polaridad se puede utilizar para la producción de la transglutaminasa de forma abierta 1, transglutaminasa 2, transglutaminasa 3, transglutaminasa 4, transglutaminasa 5, transglutaminasa 6, transglutaminasa 7 o el factor de coagulación XIII. **[0031]** Los inhibidores adecuados que son capaces de formar enlaces covalentes con las TG son inhibidores con grupos reactivos con tiol. Los grupos de tiol reactivos son preferiblemente tales grupos que son electrófilos y que son capaces de experimentar una reacción de adición nucleófila con el grupo de tiol (grupo -SH) de la cisteína tales como acetilenos, olefinas electrófilas, aldiminas insaturadas, aceptores de Michael, yodoacetamida, N-etilmaleimida, para-ácido cloromercuribenzoico, isocianatos de alquilo, 3,5-sustituido-4,5-dihidroisoxazoles, oxiranos, como se describe en la patente de los Estados Unidos. nº 5.188.830, por otra parte, imidazoles, pirazoles, triazoles y tetrazoles como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.968.713, la patente de EE.UU. nº 5.019.572, la patente de EE.UU. nº 5.021.440, la patente de EE.UU. nº 5.030.644, la patente de EE.UU. nº 5.047.416, la patente de EE.UU. nº 5.077.285, la patente de EE.UU. nº 5.084.444, la patente de EE.UU. nº 5.098.707, la patente de EE.UU. nº 5.152.988 y la patente de EE.UU. nº 5.177.092, así como el compuesto de la fórmula general



como se describe en el documento US 2002132776 A1 y otros compuestos similares con reactividad comparable en lo que se refiere a los grupos de tiol.

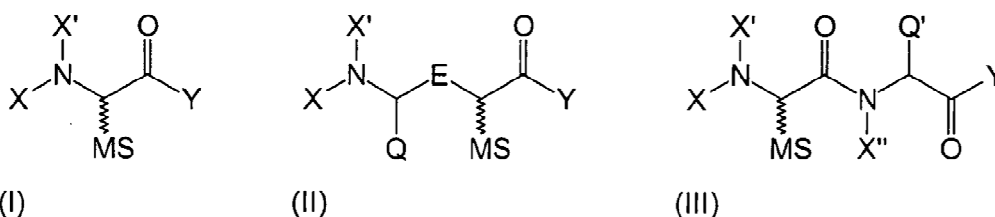
[0032] Los inhibidores preferidos que forman enlaces covalentes con las TG son inhibidores que comprenden una cadena principal de péptido o peptidomimético de la columna principal y un resto aceptor de Michael como grupo reactivo. Este resto aceptor de Michael es preferiblemente una cadena lateral unida a la columna principal peptídica o peptidomimética. Sistemas aceptores de Michael normalmente consisten en un doble enlace carbono-carbono en la conjugación a un grupo carbonilo.

[0033] Los inhibidores preferidos están representados por la fórmula general [TGL1]:



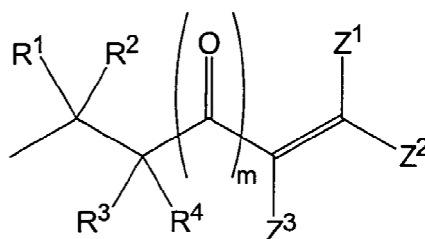
en la que m significa 0 o 1 y preferiblemente m es 0 y el doble enlace sustituido de aceptor lleva al menos un residuo de atracción de electrones capaz de conjugar con una electronegatividad $\geq 2,20$ y la columna principal es preferiblemente un péptido o peptidomimético de al menos dos aminoácidos y, preferiblemente, un tetrapéptido o al menos una dipeptidomimético y/o la columna principal muestra al menos un enlace amida. El doble enlace sustituido de aceptor es preferiblemente un sistema de Michael.

[0034] Los inhibidores preferidos están representados por la fórmula general (I), (II) o (III):



10 donde

MS es la olefina sustituida de aceptor de la estructura siguiente:



25 **E** representa el siguiente grupo -CH₂-, -CF₂-, -C₂H₄-, -CH₂-CF₂-, -CF₂-CH₂-, -CH=CH-, -CH(OH)-CH₂-, -C(=O)-CH₂-, -CH₂-NH-, -CH₂-O-, -CH(OH)-CH₂-NH-, -P(=O)(OH)-NH-, -P(=O)(OH)-O-, -P(=O)(OH)-S-, -P(=O)(OH)-CH₂-, -CH(OH)-CH₂-NH-, -C(=O)-NH-, -C(=O)-O- o -C(=O)-NX''-;

30 **m** es 0 o 1;

35 los residuos **Z**¹, **Z**², **Z**³, independientemente entre sí representan los siguientes grupos: -CO-(C₁-C₆ alquilo), -CO-R⁶, -CO-R⁷, -CO-(C₁-C₆ alquilo, halogenoalquilo), -CO-(C₃-C₁₀ heteroarilo), -CO-(C₆-C₁₅ arilo), -COO-(C₁-C₆, halogenoalquilo), -COO-(heteroarilo C₃-C₁₀), -COO-(C₆-C₁₅ arilo), -COO-(alquilo C₁-C₆), -COO-R⁸, -COO-R⁹, -CN, -F, -Cl, -COOH, -CO-NH (C₁-C₆ alquilo), -CO-N(alquilo C₁-C₆) (alquilo C₁-C₆), -CO-NR¹⁰R¹¹, -CO-NH₂, -CO-N(CR¹²R¹³R¹⁴) (CR¹⁵R¹⁶R¹⁷), -CH₂CN, -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -OCF₃, -CH₂-CF₃, -CF₂-CF₃, -NO₂, -CS-(alquilo C₁-C₆), -CS-R¹⁸, -CS-R¹⁹, -CS-O-(C₁-C₆ alquilo), -CS-O-R²⁰, -CS-O-R²¹, -CS-N(alquilo C₁-C₆)(alquilo C₁-C₆), -CS-NR²²R²³, -CS-NH₂, -CS-N(CR²⁴R²⁵R²⁶) (CR²⁷R²⁸R²⁹), -SO-R³⁰, -SO-R³¹, -SO₂-R³², -SO₂-R³³, -SO-CR³⁴R³⁵R³⁶, -SO-CR³⁷R³⁸R³⁹, -SO₂-CR⁴⁰R⁴¹R⁴², -SO₂CR⁴³R⁴⁴R⁴⁵, -SO-N(alquilo C₁-C₆) (alquilo C₁-C₆), -SO-NR⁴⁶R⁴⁷, -SO-NH₂, -SO-N(CR⁴⁸R⁴⁹R⁵⁰)(CR⁵¹R⁵²R⁵³), -SO₂-N(alquilo C₁-C₆)(alquilo C₁-C₆), -SO₂-NR⁵⁴R⁵⁵, -SO₂-NH₂, -SO₂-N(CR⁵⁶R⁵⁷R⁵⁸) (CR⁵⁹R⁶⁰R⁶¹), -SO₂-OH, -SO₂-OR⁶², -SO₂-CR⁶³R⁶⁴R⁶⁵, -SO₂-OCR⁶⁶R⁶⁷R⁶⁸, -OP(O)(OH)₂, -OP(O)(OR⁶⁹)(OR⁷⁰), -OP(O)(alquilo O-C₁-C₆) (alquilo O-C₁-C₆), -P(O)(OR⁷¹)(OR⁷²), -P(O)(alquilo O-C₁-C₆) (alquilo O-C₁-C₆), -CF₂P(O)(OR⁷³)(OR⁷⁴), -CF₂-P(O)(alquilo O-C₁-C₆)(alquilo O-C₁-C₆), en el que al menos uno de los residuos **Z**¹, **Z**², **Z**³ es diferente de hidrógeno;

45 los restos **Z**¹ y **Z**² juntos también pueden representar un resto -CO-O-CO-CH₂-, -CO-O-CH₂-CH₂-,

los residuos de **Z**² y **Z**³ juntos también pueden representar un residuo -CO-Z'-CH₂-, -CO-O-CH₂-, -CO-CH₂-CH₂-, -CO-O-CO-, -CO-NH-CO- o -Z'-CH₂-CH₂-, en el que

50 **Z**¹ representa uno de los siguientes grupos: -CH₂-, -CF₂-, -C₂H₄-, -CF₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-, -O-, -O-CH₂-, -NH- o -NH-CH₂-;

55 **Q** y **Q'** independientemente entre sí representan un residuo de la cadena lateral de un aminoácido natural; o **Q** junto con **X'** representa un residuo propilenilo; o **Q** junto con **X'** representa un residuo propilenilo;

Y representa un grupo hidroxilo, un grupo amino, grupo alquilamino C₁-C₆, grupo dialquilamino C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ grupo alcoxi, grupo ariloxi C₆-C₁₅, grupo alquilo C₁-C₆, grupo halogenoalquilo C₁-C₆, grupo heteroarilo C₃-C₁₀ o un grupo arilo C₆-C₁₅; o **Y** representa un radical de péptido de hasta 6 aminoácidos y unido a través de un enlace amida, la función de carbonilo C-terminal de los cuales los residuos de péptido llevan un grupo hidroxilo, un grupo amino, alquilo C₁-C₆ grupo alquilamino, un grupo dialquilamino C₁-C₆, grupo alcoxi C₁ C₆, un grupo alquilo C₁-C₆, grupo halogenoalquilo C₁-C₆, grupo heteroarilo C₃-C₁₀ o un grupo arilo C₆-C₁₅; o **Y** representa un residuo mimético de péptido de hasta 60 átomos de carbono y

65 **X''** representa hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; y

-**NXX'** Es un grupo amino, grupo alquilamino C₁-C₁₀, grupo amino aralquiloxycarbonilo C₆-C₁₂, grupo dialquilamino

C₁-C₁₀, heterociclo de nitrógeno C₂-C₆ o un grupo heteroarilo de nitrógeno C₃-C₅; o el grupo -NXX' forma parte de un residuo mimético de péptido de hasta 60 átomos de carbono

o

5 **X'** representa hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; y

X representa un residuo de péptido de hasta 6 aminoácidos y unido a través de un enlace amida, la N-terminal de cuyo residuo de péptido lleva un grupo amino, grupo alquilamino C₁-C₁₀, grupo alquiloxicarbonilamino C₁-C₈, grupo amino aralquiloxicarbonilo C₆-C₁₂, grupo dialquilamino C₁-C₁₀, heterociclo de nitrógeno C₂-C₆ o un grupo heteroarilo de nitrógeno C₃-C₅;

en donde cualquiera de los grupos alcoxi C₁-C₆, grupos alquilo C₁-C₆, grupos alquilamino C₁-C₁₀, grupos alquiloxicarbonilamino C₁-C₈, grupo amino aralquiloxicarbonilo C₆-C₁₂, grupos dialquilamino C₁-C₁₀, heterociclos de nitrógeno C₂-C₆, así como Los grupos heteroarilo-nitrógeno C₃-C₅ pueden estar sustituidos independientemente con hasta 5 residuos seleccionados de R⁸⁰, R⁸¹, R⁸², R⁸³, R⁸⁴,

en donde los residuos R¹ - R⁸⁴ tienen los significados como se describe en el documento WO 2008055488 A1 y formas estereoisoméricas, isómeros E/Z, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros, mezclas diastereoméricas, racematos, tautómeros, anómeros, formas ceto-enol, formas de betaina, profármacos, solvatos, hidratos, así como sales farmacológicamente aceptables de los compuestos antes mencionados.

20 **[0035]** Los inhibidores de aceptor de Michael antes mencionados, su síntesis y uso se describen explícitamente en el documento WO 2008055488 A1. Se refiere especialmente a las páginas 3 a 38 del documento WO 2008055488 A1.

25 **[0036]** TG2 fue producido por tecnología del ADN recombinante en *Escherichia coli* y se purificó hasta homogeneidad. Posteriormente se llevó a reacción, por ejemplo, con Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe que es el compuesto N α -benziloxicarbonilo-[[*(E)*-(L)-6-amino-hept-2-eno-ácido dicarboxílico]-1-etanoil]-L-glutaminilo-L-prolinilo-L-leucina éster metilo (compuesto 2) sintetizado en nuestros laboratorios de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2008055488 A1 en la página 68; compuesto 2). Mediante otro exceso de etapa de purificación se separó Z-PIMen(OEt)-qpl-OMe. La resultante TG2-Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe-aducto se cristalizó. El análisis de estructura por rayos-X demostró que la TG2 está presente en su forma abierta después de la reacción con Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe.

35 **[0037]** Sorprendentemente, se encontró que TGs o fragmentos antigénicamente activos de TGs estabilizados por los inhibidores y los inhibidores preferiblemente irreversibles tales como los inhibidores descritos anteriormente están presentes en su forma abierta, que es mucho más sensible en lo que se refiere a la detección de autoanticuerpos contra TGs o fragmentos antigénicamente activos de las TG de las TG en su forma cerrada o los fragmentos antigénicamente activos de las TG en su forma cerrada.

40 **[0038]** Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a TGs de forma abierta inmovilizada que se inmovilizan sobre, por ejemplo, placas de titulación, placas de microtitulación o placas de pocillos. Además, la presente invención se refiere a placas de titulación, placas de microtitulación o placas de pocillos con TGs de forma abierta inmovilizadas y/o fragmentos antigénicamente activos inmovilizados de TGs de forma abierta en su superficie y, especialmente, dentro de los pocillos en los que se lleva a cabo la reacción de detección.

45 **[0039]** Se encontró que la TG2 de forma abierta estabilizada o inhibida se puede utilizar para el recubrimiento de placas de microtitulación. Los sueros de donantes de sangre y de pacientes con enfermedad celíaca han sido analizados posteriormente para autoanticuerpos contra la TG2 de forma abierta en comparación con la TG2 de forma cerrada de uso común. Sorprendentemente los sueros revelaron mayores títulos de TG2 de forma abierta lo que resultó en un valor más significativo. Además algunos sueros podrían demostrar la presencia de autoanticuerpos para TG2 de forma abierta que han sido diagnosticados negativos usando la TG2 de forma cerrada como antígeno.

50 **[0040]** Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un kit para el diagnóstico de un trastorno autoinmune que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que reaccionan con al menos una transglutaminasa de forma abierta. Tal kit para el diagnóstico de un trastorno autoinmune comprende al menos una transglutaminasa de forma abierta o al menos un fragmento antigénicamente activo de una transglutaminasa de forma abierta para la detección de la presencia de autoanticuerpos específicos para la transglutaminasa de forma abierta o el fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa de forma abierta.

55 **[0041]** Estos kits pueden presentar la transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de los mismos en una forma adecuada para su uso en, por ejemplo, los métodos siguientes: EIA/ELISA, LiA, FiA, RIA, IRMA, IEMA/EIA, ILMA, IFMA, inmunodifusión, Western-blot, dot-blot, inmunohistoquímica, chips de proteínas o matrices de proteínas.

60 **[0042]** Tales kits también pueden comprender placas de titulación, placas de microtitulación o placas de pocillos con

transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta inmovilizada en la superficie de la placa.

5 **[0043]** Una forma inteligente para la fabricación de placas de titulación, placas de microtitulación o placas de pocillos con transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta inmovilizada en la superficie de la placa es el uso de la interacción de los compuestos de unión de biotina y biotina, como avidina o estreptavidina. Por lo tanto biotinilación de la transglutaminasa de forma abierta o los fragmentos antigénicamente activos de transglutaminasa de forma abierta se consigue mediante métodos enzimáticos o químicos y los productos biotinilados están obligados a superficies recubiertas con compuestos de unión biotina. Otra posibilidad es unir un inhibidor biotinilado a la TG o fragmento TG antigénicamente activo a fin de obtener TG de forma abierta que contiene el inhibidor biotinilado unido covalentemente. Dicho aducto se puede inmovilizar sobre la superficie de placas de titulación, placas de microtitulación o placas de pocillos mediante la interacción con los compuestos de unión de biotina. Por consiguiente otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de un inhibidor de la biotina para la producción de transglutaminasa de forma abierta para el sitio de inmovilización específica a las superficies recubiertas con los compuestos de unión de biotina.

20 **[0044]** Los kits descritos anteriormente pueden comprender además una transglutaminasa de forma abierta biotinilada o una forma abierta de fragmento TG antigénicamente activo biotinilado para la inmovilización de la transglutaminasa de forma abierta biotinilada o forma abierta de fragmento TG antigénicamente activo biotinilado a una superficie recubierta con compuestos de unión a biotina. Alternativamente, los kits antes descritos pueden comprender además una forma de transglutaminasa abierta o un fragmento antigénicamente activo de la misma se hace reaccionar con un inhibidor de la biotina para la inmovilización del producto inhibidor de la transglutaminasa de forma abierta biotinilada o el producto inhibidor biotinilado de fragmento antigénicamente activo a una superficie recubierta con compuestos de unión de biotina.

25 **[0045]** Otro aspecto de la presente descripción está dirigido a la producción de transglutaminasa de forma abierta usando un inhibidor relacionado con uno o más antígenos específicos para autoanticuerpos no contra TG que se encuentran en pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes. Un ejemplo sería la unión del autoantígeno en la enfermedad de Goodpasture, (no colágena-1 (NC1) de dominio de colágeno de tipo IV a través del inhibidor a la TG2. Tal construcción permitiría probar una muestra de un paciente para la presencia de dos o más autoantígenos contra diferentes proteínas simultáneamente.

35 **[0046]** El aspecto más importante de la presente invención es que la presente invención proporciona nuevos antígenos para el diagnóstico autoinmune que produce títulos más altos y más significativos que resulta en una mejor sensibilidad de diagnóstico. Además, la presente invención muestra que la conformación tiene un impacto en la activación de la enfermedad autoinmune y en consecuencia para detectar estados de enfermedad de etapa temprana.

40 **[0047]** Además, la invención implica que no transglutaminasa tisular, sino el aducto covalente entre transglutaminasa y el sustrato unido (irreversible) o inhibidor muestra el estado de la enfermedad y se correlaciona con la inflamación y atrofia de las vellosidades.

45 **[0048]** La transglutaminasa de forma abierta o inhibida se puede utilizar para el aislamiento de anticuerpos específicos a partir de muestras derivadas de pacientes, incluyendo purificación de la sangre (aféresis).

50 **[0049]** Por lo tanto, la presente invención también se refiere a transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta para su uso en purificación de la sangre, en donde transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta se utilizan para la unión y eliminación de autoanticuerpos específicos para la forma de transglutaminasa abierta o fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta de la sangre, en la que fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta son péptidos después de la reacción con un inhibidor que comprende una columna principal, una cadena principal de péptido o un esqueleto peptidomimético y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente con el grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la transglutaminasa respectiva o los fragmentos antigénicamente activos tienen una disposición de residuos de aminoácidos que forman parte de la superficie de la forma de transglutaminasa abierta expuesta a la activación de la enzima y en el que los fragmentos antigénicamente activos son capaces de provocar una respuesta de anticuerpos contra epítomos, que sólo son accesibles para los anticuerpos después de la unión de un inhibidor. Tal método utiliza el proceso de diálisis común. El material adsorbente utilizado en la columna adsorbente contiene transglutaminasa de forma abierta extracorpórea inmovilizada o fragmentos antigénicamente activos de transglutaminasa de forma abierta a fin de unir los autoanticuerpos contra la TG o el fragmento antigénicamente activo de la TG o la forma de transglutaminasa abierta o en contra del fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa de forma abierta eliminando así estos autoanticuerpos de la sangre.

65 **[0050]** En consecuencia anticuerpos específicos de forma abierta se utilizan para los enfoques terapéuticos, en los que transglutaminasa activa y por lo tanto de forma abierta deberá ser desactivada, mientras que transglutaminasa inactiva y por lo tanto de forma cerrada no se verá afectada.

5 [0051] La transglutaminasa de forma abierta o transglutaminasa inhibida estabilizada en su forma abierta se utiliza para la detección de autoanticuerpos específicos de forma abierta en muestras de fluidos corporales, secreciones o tejidos. La transglutaminasa de forma abierta o el fragmento de TG antigénicamente activo de forma abierta se utiliza para una detección más sensible y más precisa de las enfermedades autoinmunes y trastornos autoinmunes, como se describe en el presente documento.

10 [0052] Preferiblemente, el trastorno autoinmune es un trastorno de sensibilidad a proteína de cereales. Además, preferiblemente el trastorno de proteína de cereales es un trastorno de sensibilidad al gluten, con o sin la enteropatía. Más preferiblemente, el trastorno de sensibilidad al gluten se selecciona del grupo que consiste en o que comprende la enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, enfermedad de Duhring y el ataxia sensible al gluten.

15 [0053] Preferiblemente, el trastorno autoinmune se caracteriza por la epilepsia, dolor de cabeza con anomalías de sustancia blanca, neuropatía, una esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o síndrome de persona rígida.

20 [0054] Preferiblemente, el trastorno autoinmune es un trastorno de sensibilidad al gluten con síntomas neurológicos seleccionados entre el grupo consistente en, o que comprende: neuropatía, dolor de cabeza con anomalías de la materia blanca, o el síndrome de persona rígida.

[0055] Preferiblemente, el trastorno autoinmune que se caracteriza por una disfunción neurológica es la ataxia, la encefalitis, o polimiositis.

25 [0056] Preferiblemente, el trastorno autoinmune es una enfermedad autoinmune endocrinológica seleccionada de entre el grupo consistente de o que comprende: diabetes mellitus de tipo 1, enfermedad de Addison y tiroiditis de Hashimoto.

[0057] Preferiblemente, el trastorno autoinmune es la dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring).

30 [0058] Preferiblemente, el trastorno autoinmune es una enfermedad autoinmune gastrointestinal seleccionada del grupo que consiste de o que comprende: enfermedad celíaca, y colitis ulcerosa.

35 [0059] Preferiblemente, la TG2 de forma abierta se utiliza para los autoanticuerpos de detección en el suero de pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos contra TG2 de forma abierta. Por otra parte la TG2 de forma abierta se usa preferiblemente para la detección de autoanticuerpos en muestras de pacientes que sufren de un trastorno sensible al gluten, especialmente que sufren de la enfermedad celíaca. Una realización preferida de la presente invención está dirigida al uso de la TG2 de forma abierta para la detección de autoanticuerpos específicos en pacientes con enfermedad celíaca que no tienen títulos o tienen títulos bajos de anticuerpos contra TG2 de forma abierta.

40 [0060] En otra realización de la presente invención la TG2 de forma abierta se utiliza para la detección de autoanticuerpos en pacientes que padecen diabetes mellitus de tipo 1 y en una realización todavía adicional de la presente invención, la TG2 de forma abierta se utiliza para la detección de autoanticuerpos específicos en pacientes con enfermedad celíaca de reciente comienzo, que todavía no desarrollaron anticuerpos contra la TG2 de forma cerrada.

45 [0061] Preferiblemente, la TG3 de forma abierta se utiliza para la detección de autoanticuerpos en el suero de pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos contra TG3 de forma abierta. Por otra parte la TG3 de forma abierta se usa preferiblemente para la detección de autoanticuerpos en muestras de pacientes que sufren de dermatitis herpetiforme.

50 [0062] Preferiblemente, la TG6 de forma abierta se utiliza para la detección de autoanticuerpos en el suero de pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos contra TG6 de forma abierta. Por otra parte la TG6 de forma abierta se usa preferiblemente para la detección de autoanticuerpos en muestras de pacientes que sufren de neuropatía, ataxia o ataxia sensible al gluten o síndrome de persona rígida.

55 [0063] En la presente invención cualquier método y dispositivo adecuado para la detección de diagnóstico de las proteínas o anticuerpos en muestras de fluidos corporales o en muestras de tejido se pueden utilizar para detectar autoanticuerpos que reaccionan con transglutaminasas de forma abierta. Ejemplos de tales métodos y dispositivos incluyen: EIA/ELISA, LiA, FiA, RIA, IRMA, IEMA/EIA, ILMA, IFMA, inmunodifusión, Western-blot, Dot-blot, inmunohistoquímica, chips de proteínas o matrices de proteínas. Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a chips de proteínas y matrices de proteínas que contienen al menos una transglutaminasa de forma abierta o al menos un fragmento antigénicamente activo de TG de forma abierta preferiblemente en una forma inmovilizada. Tales chips y ensayos pueden contener preferiblemente más de una isoforma de transglutaminasa de forma abierta seleccionada de transglutaminasa 1, transglutaminasa 2, transglutaminasa 3, transglutaminasa 4, transglutaminasa 5, transglutaminasa 6, transglutaminasa 7, o el factor de coagulación XIII, preferentemente en una forma

inmovilizada.

5 **[0064]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas y composiciones farmacéuticas que contienen la forma abierta de una TG junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente, disolvente y/o diluyentes.

10 **[0065]** Las preparaciones y formulaciones preferidas están en forma administrable, que es adecuada para la aplicación oral o inyección. Estas formas administrables incluyen píldoras, comprimidos, comprimidos con lámina, comprimidos recubiertos, cápsulas, soluciones, dispersiones y depósitos.

15 **[0066]** Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, la TG de forma abierta se puede combinar con cualquier vehículo oral no tóxico farmacéuticamente aceptable inerte, tal como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (formas líquidas) y similares. Por otra parte, cuando se desee o sea necesario, aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes también se pueden incorporar en la mezcla.

20 **[0067]** Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, alginato de sodio, carboximetilo-celulosa, polietilenglicol y ceras. Entre los lubricantes que se pueden mencionar para uso en estas formas de dosificación son el ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Los disgregantes incluyen almidón, metilcelulosa, goma guar y similares. Agentes edulcorantes y aromatizantes y conservantes también pueden incluirse cuando sea apropiado. Algunos de los términos indicados anteriormente, a saber disgregantes, diluyentes, lubricantes, aglutinantes y similares, se discuten con más detalle a continuación.

25 **[0068]** Adicionalmente, las composiciones de la presente invención se pueden formular en forma de liberación sostenida para proporcionar una liberación controlada de la TG de forma abierta. Formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos estratificados que contienen capas de tasas que varían de disgregación o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los componentes activos y conformados en forma de comprimidos o cápsulas que contienen tales matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

30 **[0069]** Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, especialmente para la inyección. Como un ejemplo se pueden mencionar soluciones de glicol de agua o agua-propileno para inyecciones parenterales o adición de edulcorantes y opacificantes para soluciones orales, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones en forma líquida también pueden incluir soluciones para administración intranasal.

35 **[0070]** Las preparaciones en aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un gas comprimido inerte, por ejemplo, nitrógeno.

40 **[0071]** Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos tales como manteca de cacao se funde primero, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente por agitación o mezcla similar. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y de ese modo se solidifica.

45 **[0072]** También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, especialmente para la inyección.

50 **[0073]** El término cápsula se refiere a un recipiente especial o recinto hecho de metilcelulosa, alcoholes de polivinilo, o gelatinas desnaturalizadas o almidón para sostener o contener composiciones que comprenden los ingredientes activos. Cápsulas de cáscara dura se hacen típicamente de mezclas de gelatinas de hueso y piel de cerdo de fuerza de gel relativamente alta. La propia cápsula puede contener pequeñas cantidades de colorantes, agentes opacificantes, plastificantes y conservantes.

55 **[0074]** Compromido significa forma de dosificación sólida comprimida o moldeada que contiene los ingredientes activos con diluyentes adecuados. El comprimido puede prepararse por compresión de mezclas o granulaciones obtenidas por granulación húmeda, granulación seca o por compactación bien conocida para una persona experta en la técnica.

60 **[0075]** Geles orales se refiere a los ingredientes activos dispersados o solubilizados en una matriz semisólida hidrófila.

65 **[0076]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a TG de forma abierta o a formulaciones farmacéuticas y composiciones farmacéuticas que contienen TG de forma abierta para el uso en terapia.

[0077] Estas preparaciones farmacéuticas se pueden usar preferiblemente para una terapia de hiposensibilización para pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes causadas por una intolerancia al gluten. En consecuencia, otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de una forma abierta de una TG, como TG2, para la preparación de una composición farmacéutica para la hiposensibilización de un paciente que sufre de un trastorno autoinmune causado por una intolerancia al gluten.

[0078] Tal como se utiliza aquí, el término "terapia de hiposensibilización" se refiere a una desensibilización inmunológica o alérgica de inmunoterapia específica, en los que un paciente se vacuna con dosis inicialmente bajas de una forma abierta TG como TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7 o el factor de coagulación XIII, que se aumentó durante el período de tratamiento con el objetivo de inducir tolerancia inmunológica.

[0079] Por consiguiente, la presente invención describe un método para la hiposensibilización de un mamífero incluyendo un ser humano mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una TG de forma abierta a dicho mamífero que sufrió de un trastorno autoinmune causado por la intolerancia al gluten. La TG de forma abierta o inhibida se administra preferiblemente a partir de las dosis bajas con el aumento de dosis durante el período de tratamiento después de una dieta libre de gluten del paciente y en un momento en que el paciente no presenta síntomas de la enfermedad autoinmune, que podría medirse clínicamente o por biopsia o serología.

Descripción de las figuras

[0080]

Figura 1 muestra la estructura de TG2 - Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe-conjugado revelando la conformación abierta de TG2. N: fibronectin N-terminal de dominio de unión; Núcleo: dominio del núcleo catalítico; $\beta 1$ y $\beta 2$: dominios de hoja beta; I: Inhibidor (Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe)

Figura 2 título de autoanticuerpos de tipo IgA en sueros de pacientes con atrofia de vellosidades mucosas abiertas del intestino delgado

Figura 3 título de autoanticuerpos de tipo IgA en sueros de pacientes con enfermedad celíaca de etapa temprana

Figura 4 título de autoanticuerpos de tipo IgA en sueros de pacientes con enfermedad celíaca tratada no responsiva

Figura 5 título de autoanticuerpos de tipo IgA en el suero de pacientes con atrofia de vellosidades mucosa abierta del intestino delgado y durante un año en una dieta sin gluten.

Figura 6 título de autoanticuerpos de tipo IgA en el suero de las primeras etapas de la enfermedad celíaca-pacientes después de un año de dieta sin gluten

Figura 7 título de autoanticuerpos de tipo IgA en sueros de pacientes en los que la enfermedad celíaca se ha sospechado, pero hasta ahora no podía ser diagnosticada por los métodos de diagnóstico de enfermedad celíaca disponibles.

Figura 8 título de autoanticuerpos de tipo IgA en el suero de los pacientes tratados con dieta sin gluten. Se muestran 50 muestras descritas en el texto con títulos cercanos al punto de corte. Los sueros han sido ordenados de acuerdo al título de forma abierta.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de TG2 de forma abierta estabilizada

[0081] Las células de *Escherichia coli* productoras de TG2 recombinante se centrifugaron a 3.700 rpm durante 20 minutos. El sedimento se resuspendió en tampón y se lisaron mediante homogeneización a alta presión. Después de la centrifugación, el sobrenadante se aplicó a una columna que contiene resina de Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania). La columna se lavó con tampón hasta que se alcanzó la línea de base. A continuación, TG2 se eluyó en un tampón que contiene imidazol 300 mM. Las fracciones que contenían TG2 se reunieron y se purificaron adicionalmente por intercambio aniónico y cromatografía de permeación en gel. Preparación de TG2 de forma abierta estabilizada para la cristalización se realizó incubando TG2 recién preparada con Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe (inhibidor) en una proporción de 1 a 50 a temperatura ambiente durante 30 min y después a 4°C durante la noche. El inhibidor en exceso se separó por cromatografía de intercambio aniónico. El conjugado TG2-inhibidor se concentró a 8 mg/mL. Se añadió glicerol a una concentración final de 10%. Se llevó a cabo el almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 2

Cristalización y verificación de forma abierta

[0082] La cristalización se ha realizado aplicando el método de difusión de vapor de gota posada y 1,75 a 2,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM HEPES pH 6,75 a 7,5 a 18°C. Cristales en forma rómbica aparecieron en 5 a 7 días (Grupo espacial: P4₁2₁2; constantes de célula de unidad: a, b=71,0 Å, C=310,4 Å). El conjunto de datos se recogió con radiación de sincrotrón y produjo una resolución de 2,5 Å. El procesamiento de los datos permite determinar la posición del inhibidor en la TG2 y confirmó la conformación abierta.

Ejemplo 3**Recubrimiento de microtitulación de placas con TG2 de forma abierta**

[0083] TG2 de forma abierta o inhibida se ha producido como se describe en el ejemplo 1. Las placas Nunc Lockwell Maxisorp se han recubierto durante la noche a 4°C con 100 µl por solución de revestimiento de pocillo, compuesto de 20 mM Tris-HCL, pH 7,4, NaCl 150 mM y 1 µg/ml TG2 de forma abierta. Después, la solución de revestimiento se eliminó y las placas se lavaron intensamente con TBS (20 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl) que contenía 0,01% de Tween 20. El bloqueo se realizó mediante la adición de 200 µl de TBS que contiene 3% de albúmina de suero bovino durante 1 hora. La solución de bloqueo se retiró y las placas se lavaron intensamente con TBS (20 mM Tris-HCL, pH 7,4, NaCl 150 mM) que contiene 0,01% de Tween 20.

Ejemplo 4**Análisis de los sueros**

[0084] Los sueros de pacientes con enfermedad celíaca y de donantes de sangre han sido analizados para anticuerpos contra la TG2 de forma cerrada y la TG2 de forma abierta por Ensayos inmunosorbentes unidos a enzimas (ELISA). Para la detección de autoanticuerpos de tipo IgA contra TG2 de forma cerrada ELISA-Kit E001 de Zedira GmbH, Darmstadt, Alemania se utilizó, mientras que para autoanticuerpos de tipo IgG el kit de E002 de Zedira GmbH, Darmstadt, Alemania se utilizó.

[0085] Para la detección de anticuerpos IgA e IgG contra TG2 de tipo conformación abierta se han utilizado las placas de microtitulación como se describe en el ejemplo 3. Todos los demás componentes necesarios para la realización de las pruebas ELISA se han tomado de los kits Zedira E001 y E002, respectivamente. De acuerdo con ello se han utilizado los protocolos de E001 y E002: se han diluido 10 µl de cada suero con 990 µl de tampón de muestra, se mezcla a fondo y se centrifuga para sedimentar las partículas insolubles. Inmediatamente antes de su uso, la fase sólida se lavó una vez con 350 µl de tampón de lavado por pocillo. Después de 10 segundos la mantequilla de lavado se eliminó completamente. 100 µl de los calibradores, el control negativo y positivo y las muestras diluidas rápidamente se han dispensado en los pocillos de placas micro. Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente los pocillos han sido lavados 4 veces con 350 µl de tampón de lavado. Usando una pipeta de 8 canales se han dispensado 100 µl de conjugado por pocillo y se incubaron posteriormente durante 30 min. Después de un procedimiento de lavado adicional, una solución de 100 µl de sustrato se dispensó en los pocillos y se incubaron durante 30 minutos. A continuación, se añadió solución de parada 100 µl. Finalmente las placas se agitaron en un agitador orbital durante unos 10 segundos y la absorbancia a 450 nm se ha determinado.

[0086] Los resultados se dan en la Tab. 1 - 4. Sorprendentemente, los estándares (mezcla de sueros de pacientes con enfermedad celíaca) produjeron valores de extinción significativamente superiores a 450 nm cuando la TG2 de forma abierta se utilizó como antígeno en el IgG-ELISAs (Tab 1 y 2.). Esto demuestra un título alto de anticuerpos para TG2 de forma abierta en los estándares que a TG2 de forma cerrada. El suero del donante de sangre 26, que se dio positivo en la forma cerrada ELISA es claramente negativo en ELISA de forma abierta. Por lo tanto, la TG2-ELISA de forma abierta proporciona resultados positivos falsos en menos diagnósticos autoinmunes (Tab 2).

Tabla 1: anti-IgG-ELISAs usando TG2 estándar (forma cerrada) y la forma abierta novelada de TG2 en sueros de donantes de sangre. Los valores positivos se escriben en negrita.

ES 2 602 628 T3

	anti-IgG ELISAs	TG2 de forma cerrada		TG2 de forma abierta	
		donantes de sangre	$\Delta E_{450 \text{ nm}}$ [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)	$\Delta E_{450 \text{ nm}}$ [mOD]
5	Estándar 1	43	0	47	0
	Estándar 2	162	1	327	1
	Estándar 3	376	3	733	3
	Estándar 4	817	10	1492	10
	Estándar 5	1429	30	2283	30
	Estándar 6	2038	100	2716	100
10	Nº de suero				
	1	137	0,79	237	0,66
	2	131	0,74	174	0,44
	3	132	0,74	192	0,50
	4	148	0,88	217	0,59
15	5	150	0,90	239	0,67
	6	137	0,79	189	0,49
	7	112	0,58	188	0,49
	8	155	0,94	222	0,61
	9	125	0,69	200	0,53
20	10	97	0,45	147	0,35
	11	168	1,05	190	0,50
	12	184	1,19	264	0,76
	13	154	0,93	160	0,39
	14	162	1,00	219	0,60
25	15	161	0,99	259	0,74
	16	252	1,80	300	0,90
	17	142	0,83	201	0,53
	18	166	1,03	241	0,68
	19	130	0,73	202	0,54
30	20	123	0,67	164	0,40
	21	136	0,78	234	0,65
	22	171	1,08	251	0,71
	23	163	1,01	238	0,67
	24	115	0,60	191	0,50
35	25	143	0,84	226	0,62
	26	535	4,89	380	1,21
	27	125	0,69	188	0,49
	28	161	0,99	235	0,66
	29	214	1,45	296	0,88
40	30	198	1,31	276	0,81
	31	183	1,18	227	0,63
	32	144	0,85	214	0,58
	33	96	0,44	146	0,34
	34	151	0,91	228	0,63
45	35	151	0,91	241	0,68
	36	130	0,73	183	0,47
	37	140	0,81	214	0,58
	38	117	0,62	170	0,43
	39	167	1,04	223	0,61
50	40	168	1,05	252	0,72

55

Tabla 2: anti-IgG-ELISAs usando TG2 estándar (forma cerrada) y la nueva TG2 de forma abierta en suero de pacientes con enfermedad celíaca. Los valores positivos se escriben en negrita

60

65

ES 2 602 628 T3

anti-IgG ELISAs		TG2 de forma cerrada		TG2 de forma abierta	
Suero de pacientes		$\Delta E450$ nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)	$\Delta E450$ nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)
5		44	0	51	0
		161	1	351	1
	Estándar 1 Estándar 2 Estándar 3	363	3	763	3
10	Estándar 4 Estándar 5 Estándar 6	833	10	1530	10
		1440	30	2327	30
		1969	100	2755	100
15	Nº de suero				
	41	201	1,36	519	1,69
	42	109	0,55	159	0,35
	43	154	0,94	204	0,49
	44	176	1,14	233	0,59
	45	142	0,84	461	1,44
20	46	119	0,63	281	0,75
	47	112	0,57	186	0,43
	48	148	0,89	284	0,76
	49	110	0,56	165	0,36
	50	700	7,57	1427	8,68
25	51	976	13,09	1716	12,74
	52	130	0,73	231	0,58
	53	128	0,72	462	1,44
	54	143	0,84	200	0,48
	55	90	0,39	135	0,27
30	56	116	0,61	164	0,36
	57	107	0,53	117	0,21
	58	88	0,37	105	0,17
	59	79	0,30	92	0,13
	60	97	0,45	172	0,39
35	61	100	0,47	144	0,30
	62	104	0,51	139	0,28
	63	99	0,47	134	0,26
	64	102	0,49	121	0,22
	65	115	0,60	129	0,25
40	66	144	0,85	228	0,57
	67	559	5,43	1355	7,84
	68	365	2,98	673	2,47
	69	263	1,96	795	3,20
	70	152	0,92	246	0,63
45	71	90	0,39	166	0,37
	72	300	2,33	325	0,91
	73	235	1,68	455	1,41
	74	89	0,38	172	0,39
	75	133	0,75	385	1,13
50	76	77	0,28	161	0,35
	77	115	0,60	171	0,38
	78	219	1,54	302	0,83
	79	331	2,66	1093	5,34
55	80	107	0,54	133	0,26

[0087] La detección de autoanticuerpos del tipo IgG en el suero del paciente (Tab 2) reveló valores mUnit inferiores en la mayoría de todos los sueros que dieron resultados negativos, el agrandamiento de la distancia al punto de corte. Los sueros 50, 51 y 67 han sido positivos en la TG2 de forma cerrada y abierta, pero los títulos de la forma abierta de nuevo han demostrado ser más altos para dos sueros. Mientras que el suero 68 era positivo en la forma cerrada y negativo en la forma abierta de ELISA, los sueros 69 y 79 se podían demostrar positivos con la ELISA de forma abierta.

[0088] En el Resumen, el uso de TG2 de forma abierta como antígeno en IgG-diagnósticos de enfermedad celíaca, resultó en una mayor especificidad y sensibilidad diagnóstica de TG2 de forma abierta.

[0089] Los resultados de la detección de autoanticuerpos de tipo IgA se presentan en la Tab. 3 (sueros de donantes de sangre). Mientras que la TG2-ELISA de forma cerrada puede detectar 1 suero positivo (26), TG2 de forma abierta detectó 5 sueros positivos (4, 17, 25, 26, 27).

5 **[0090]** A partir de 3 pacientes negativos, sueros que utilizan TG2 de forma cerrada, 1 se pudo detectar positivo utilizando la TG2 de forma abierta, lo que aumenta la sensibilidad de diagnóstico (Tab. 4).

10 **[0091]** Con dos excepciones, valores de unidad más altos se han medido en el suero del paciente utilizando la TG2 de forma abierta. Sueros de varios pacientes como 49, 71, 76 o 80 mostraron títulos más de 100% más altos en el ensayo de forma abierta. Esto muestra que los pacientes tienen anticuerpos específicos a la conformación abierta de la TG2. Especialmente cuando los títulos están cerca del límite, la TG2 de forma abierta produce resultados más fiables de diagnóstico (e. g. de suero 61 y 70).

15 **[0092]** Los resultados de análisis de sueros de pacientes adicionales se describen en los siguientes:

El paciente número A es un niño, con diagnóstico de enfermedad celíaca mediante histología tras la biopsia. Mientras que resultados negativos o dudosos se obtienen usando un diagnóstico estándar (2,0 U/ml para IgG y 1,2 U/ml para IgA, límite = 3 U/ml), el antígeno novedoso es capaz de detectar anticuerpos tempranos. (13 U/ml para IgG y 45 U/ml para IgA)

20 **[0093]** El paciente número B y C se presentaron al médico con síntomas severos de enfermedad celíaca confirmada por biopsia. Sin embargo, sólo se han encontrado títulos bajos o dudosos comparables contra TG2 (2,9 o 3,5 U/ml, límite = 3 U/ml). De hecho, el nuevo antígeno muestra títulos tremendamente altos que se correlacionan con la severidad de la inflamación y atrofia de las vellosidades (paciente B, Marsh II mediante biopsia: 19 U/ml, Paciente C, Marsh III de la biopsia: 39 U/ml).

[0094] El paciente D fue diagnosticado con diabetes tipo uno. Mientras que el ELISA estándar no muestra anticuerpos contra TG2, el antígeno novedoso pudo detectar IgG (11 U/ml), así como anticuerpos de IgA (46 U/ml).

30 **[0095]** El paciente E fue diagnosticado con psoriasis. Mientras que no se detectaron autoanticuerpos TG2 con la prueba ELISA estándar, valores que son claramente positivos (IgA: 37 U/ml, IgG: 21 U/ml) se han obtenido utilizando la TG2 de forma abierta como antígeno en el ELISA.

35 **[0096]** En conclusión, hemos demostrado la presencia de autoanticuerpos de la IgA y la de tipo IgG que reconocen específicamente la conformación abierta TG2. El uso de TG2 de forma abierta aumenta la sensibilidad y especificidad diagnóstica en los diagnósticos correspondientes autoinmunes, por ejemplo, diagnóstico de la enfermedad celíaca.

40 **[0097]** Por lo tanto, con la TG2 de forma abierta de nuevo desarrollo, se proporciona un antígeno de diagnóstico novedoso que ayuda a mejorar el diagnóstico basado en TG2. Se puede utilizar en todos los métodos utilizados para la detección de anticuerpos en muestras de fluidos corporales o muestras de tejido. Ejemplos de tales métodos incluyen: EIA/ELISA, LiA, FiA, RIA, IRMA, IEMA/EIA, ILMA, IFMA, inmunodifusión, Western-blot o Dot-blot. Cualquiera de estos métodos podrían ser adaptados para fines de diagnóstico utilizando el antígeno descrito aquí en detalle por una persona experta en la técnica.

45 **[0098]** Al estar transglutaminasas estructuralmente relacionadas, el fenómeno descubierto sorprendentemente para TG2 y descrito en detalle en esta solicitud, será también aplicable a otras transglutaminasas como TG3 en el diagnóstico de la dermatitis herpetiforme o TG6 en el diagnóstico de trastornos neurológicos sensibles al gluten.

50 Tabla 3: anti-IgA-ELISAs usando TG2 estándar (forma cerrada) y la nueva TG2 de forma abierta en sueros de donantes sanos. Los valores positivos se escriben en negrita.

55

60

65

ES 2 602 628 T3

anti-IgA ELISAs		TG2 de forma cerrada		TG2 de forma abierta	
Suero de donantes de sangre		ΔE_{450} nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)	ΔE_{450} nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)
5	Estándar 1	45	0	45	0
	Estándar 2	101	1	108	1
	Estándar 3	209	3	220	3
	Estándar 4	537	10	568	10
	Estándar 5	1161	30	1264	30
	Estándar 6	2185	100	2322	100
10	Nº de suero				
	1	86	0,73	120	1,20
	2	84	0,70	106	0,97
	3	137	1,65	177	2,20
	4	148	1,86	251	3,59
15	5	80	0,62	110	1,03
	6	97	0,93	172	2,11
	7	104	1,05	173	2,13
	8	115	1,25	198	2,59
20	9	121	1,36	166	2,00
	10	57	0,21	68	0,36
	11	78	0,59	106	0,97
	12	74	0,52	117	1,15
	13	118	1,31	188	2,40
25	14	89	0,78	115	1,12
	15	115	1,25	145	1,63
	16	81	0,64	114	1,10
	17	128	1,49	252	3,60
	18	84	0,70	107	0,98
30	19	90	0,80	136	1,47
	20	70	0,45	87	0,66
	21	88	0,77	168	2,04
	22	85	0,71	140	1,54
	23	87	0,75	105	0,95
35	24	57	0,21	72	0,42
	25	147	1,84	513	8,81
	26	212	3,06	559	9,80
	27	118	1,31	226	3,11
	28	91	0,82	155	1,81
40	29	121	1,36	178	2,22
	30	103	1,04	160	1,89
	31	97	0,93	133	1,42
	32	71	0,46	98	0,84
	33	89	0,78	113	1,08
45	34	76	0,55	95	0,79
	35	100	0,98	154	1,79
	36	71	0,46	76	0,49
	37	84	0,70	127	1,32
	38	62	0,30	85	0,63
50	39	74	0,52	117	1,15
	40	81	0,64	122	1,23

Tabla 4: anti-IgA-ELISAs utilizando TG2 estándar (forma cerrada) y la forma abierta novelada de TG2 en sueros de pacientes con enfermedad celíaca. Los valores positivos se escriben en negrita.

55

60

65

anti-IgA ELISAs		Closed form TG2		Open form TG2	
Sueros de pacientes de enfermedad celíaca		$\Delta E450$ nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)	$\Delta E450$ nm [mOD]	U/mL (Límite: 3 U/ml)
5	Estándar 1	45	0	45	0
	Estándar 2	101	1	108	1
	Estándar 3	209	3	220	3
	Estándar 4	537	10	568	10
	Estándar 5	1161	30	1264	30
10	Estándar 6	2185	100	2322	100
	Nº de suero				
	41	262	4,00	363	5,78
	42	299	4,75	479	8,09
	43	350	5,80	457	7,64
15	44	579	11,22	829	16,31
	45	509	9,44	690	12,73
	46	724	15,16	1160	27,02
	47	821	18,07	1041	22,76
20	48	1889	72,59	2326	105,61
	49	1174	30,91	2132	86,06
	50	1464	44,42	2050	78,51
	51	1617	53,08	2169	89,71
	52	1865	70,57	2346	107,65
	53	1911	74,43	2487	122,04
25	54	1297	36,27	1804	59,31
	55	351	5,82	431	7,12
	56	474	8,61	693	12,80
	57	414	7,21	644	11,66
	58	346	5,72	542	9,39
30	59	277	4,30	437	7,24
	60	87	0,79	111	1,14
	61	308	4,92	501	8,53
	62	326	5,31	532	9,18
	63	193	2,70	306	4,70
35	64	362	6,07	570	10,00
	65	373	6,30	588	10,38
	66	83	0,71	128	1,45
	67	1665	56,14	2270	99,85
40	68	3176	201,73	3354	210,44
	69	1975	79,95	2340	107,04
	70	246	3,69	360	5,74
	71	505	9,36	1261	31,03
	72	1356	39,00	1506	42,09
45	73	1372	39,78	1808	59,60
	74	409	7,10	632	11,37
	75	2126	94,57	2751	148,92
	76	309	4,95	678	12,46
	77	604	11,86	898	18,26
50	78	2208	102,96	2595	133,01
	79	2365	118,98	2830	157,03
	80	284	4,45	610	10,88

Ejemplo 5

Hiposensibilización de un paciente

[0099] Paciente F sufría de la enfermedad celíaca y ha estado en una dieta libre de gluten durante 8 años. De acuerdo con la biopsia y serología, el paciente F estaba en remisión y no mostró más síntomas de enfermedad celíaca. El paciente F se inyectó por vía subcutánea una solución que contiene TG2 abierta, que ha sido producida de acuerdo con el ejemplo 1. Las inyecciones se han repetido semanalmente durante un período de seis meses; las dosis se han aumentado durante este periodo con el fin de alcanzar la dosis de mantenimiento. A continuación la aplicación se ha repetido mediante la aplicación de la dosis de mantenimiento una vez al mes durante 1,5 años. El paciente F se mantuvo en una dieta estricta sin gluten durante todo este período de terapia de hiposensibilización. Más tarde, el paciente comenzó a consumir cantidades menores (1 g por día) de gluten, además de la dieta libre de gluten. Ninguna síntoma de enfermedad celíaca podría medirse clínicamente o por biopsia o serología.

[0100] El ejemplo 5 demuestra que la forma abierta de una TG puede ser utilizada para una terapia de hiposensibilización para pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes causadas por una intolerancia al gluten.

5

Ejemplo 6

Análisis de suero

[0101] Suero adicional se ha analizado según el protocolo descrito en el Ejemplo 4. Los grupos de pacientes 1 a 5 se definen por un diagnóstico de enfermedad celíaca positivo, pero un título bajo o negativo para autoanticuerpos de TG2 tal como se mide por ensayos clásicos utilizando TG2 cerrada como antígeno.

El grupo 1 se define por atrofia de vellosidades de mucosa intestinal abierta pequeña. Se han analizado 30 sueros de este tipo. En general, el título de autoanticuerpos medido con la TG2 de forma abierta era mayor que la medida para la TG2 de forma cerrada. 14 sueros fueron ligeramente positivos en la TG2 IgA-ELISA de forma cerrada, mientras que en la TG2 IgA-ELISA de forma abierta 28 sueros se pudieron detectar positivos, como se muestra en la figura 2. Por lo tanto 93% de los pacientes se pudo detectar serológicamente utilizando la TG2 de forma abierta como antígeno, mientras que sólo el 47% puede ser detectado con TG2 de forma cerrada. Por lo tanto la TG2 de forma abierta es capaz de detectar la mayoría de los pacientes con enfermedad celíaca que no es el caso de la TG2 de forma cerrada. En la IgG ELISA sin sueros positivos se pudo detectar mediante la TG2 de forma cerrada como antígeno, mientras que 5 sueros han sido detectados como positivos mediante la TG2 de forma abierta. Esto muestra que TG2 de forma abierta también es capaz de detectar más autoanticuerpos de tipo IgG que TG2 de forma cerrada y por lo tanto es capaz de detectar más pacientes con enfermedad celíaca por serología basada en ELISA.

El grupo 2 se define por la enfermedad celíaca de fase temprana caracterizada por la enteropatía leve. Se han analizado 14 sueros. De nuevo, los títulos son generalmente más altos para la TG2 de forma abierta. 6 sueros (42%) han sido positivos para los autoanticuerpos de tipo IgA contra TG2 cerrada mientras que 13 (93%) se revelaron positivos utilizando la TG2 de forma abierta como antígeno (fig. 3). Por lo tanto, también en el grupo de enfermedad celíaca de estado temprano, la TG2 de forma abierta es capaz de detectar la mayoría de los pacientes con enfermedad celíaca por serología que de nuevo no es el caso de TG2 de forma cerrada.

El grupo 3 se define por la enfermedad celíaca tratada no responsiva. 16 pacientes han sido analizados. De nuevo, los títulos son generalmente más altos para la TG2 de forma abierta. 3 (19%) sueros han sido positivos para la TG2-ELISA (IgA) de forma cerrada, mientras que 9 (56%) han sido positivos utilizando la TG2 de forma abierta como antígeno (fig. 4). Por lo tanto, la TG2 de forma abierta es capaz de detectar alrededor de tres veces más pacientes con enfermedad celíaca mediante serología en este grupo.

El grupo 4 se define por la atrofia de vellosidades de mucosa intestinal abierta pequeña y durante un año en la dieta sin gluten. El uso de TG2-ELISA de forma cerrada, los 21 pacientes no mostraron más autoanticuerpos TG2. La prueba de sueros con TG2-ELISA de forma abierta demostró que en 5 pacientes (24%) TG2-autoanticuerpos están todavía presentes (fig. 5). Por lo tanto, TG2 abierta es capaz de detectar cantidades incluso menores de TG2-autoanticuerpos y ayuda a detectar pacientes con enfermedad celíaca donde la dieta libre de gluten no es completamente exitosa.

El grupo 5 se define por las primeras etapas de CD-pacientes después de un año de dieta sin gluten. La forma cerrada mostró dieta exitosa para todos los 11 pacientes (no más TG2-autoanticuerpos), mientras que la forma abierta mostró para 4 pacientes que TG2-autoanticuerpos están todavía presentes (fig. 6), lo que indica que la dieta no ha tenido un éxito completo.

El grupo 6 está definido por pacientes en los que la enfermedad celíaca se ha sospechado, pero hasta el momento no pudo ser diagnosticada por los métodos de diagnóstico de enfermedad celíaca disponibles. 4 de los 25 sueros salieron positivos en el uso de la TG2 de forma abierta (Fig. 7). Así, estos 4 pacientes podrían ser detectados como pacientes con enfermedad celíaca.

El grupo 7 es una cohorte de 150 pacientes no seleccionados con enfermedad celíaca en la dieta libre de gluten. 52 sueros (35%) salieron positivos en la TG2-IgA-ELISA de forma cerrada, mientras que 71 (48%) han sido positivos en la IgA-ELISA de forma abierta. La figura 8 muestra los datos de los casos más interesantes cerca del límite, donde la mayoría de los resultados de TG2-ELISA son negativos. Por lo tanto diagnósticos basados en TG2 abiertas revelaron que no una tercera parte, sino la mitad de los pacientes todavía tienen autoanticuerpos TG2, lo que indica que no seguían una dieta con éxito.

Ejemplo 7

Construcción de TG2 de forma abierta usando inhibidores adicionales

[0102] Abierto de TG2 ha sido preparado según el ejemplo 1, pero utilizando los siguientes inhibidores:

- A. Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe (inhibidor descrito en el ejemplo 1)
- B. Boc-(6-diazo-5-oxonorleucinilo) -QIV-OMe
- C. Z-PIMen(OMe)-V-tetrahidroindolizina-OMe

65

D. Ac-LGPG-(DON)-SLVIG-OMe
 E. 1,3,4,5-tetrametil-2[(2-oxopropil)tio] cloruro de imidazolío

5 **[0103]** A es un inhibidor basado en el aceptor Michael con una cadena principal peptídica. B también tiene una cadena principal peptídica, pero diazo-5-oxonorleucina (o "DON") como grupo reactivo. C es un aceptor Michael con una cadena principal peptidomimética. Mientras que A y B tienen cadenas de gluten derivadas, D tiene una secuencia de caseína y por lo tanto, no se deriva de gluten. E es una molécula no peptídica, no peptidomimética que alquila la cisteína del sitio activo de la transglutaminasa.

10 **[0104]** Microplacas entonces se han recubierto con variantes de TG2 respectiva de conformación abierta de acuerdo con el Ejemplo 3. 10 sueros de pacientes con enfermedad celíaca han sido analizados de acuerdo con el ejemplo 4 para autoanticuerpos de tipo IgA con placas recubiertas con variantes de TG2 de forma cerrada, y TG2 de forma abierta preparadas usando los inhibidores A, B, C, D y E.

15 **[0105]** Los resultados dados en la siguiente tabla muestran que la señal obtenida es independiente del inhibidor utilizado para la preparación de la TG2 de conformación abierta estabilizada. También puede verse que la TG2 de forma abierta produce títulos más altos y puede ayudar a diagnosticar a los pacientes que tienen un título negativo en el ensayo TG2 cerrado (sueros PS148 y PSE1).

20 Tabla 5: anti-IgA-ELISA usando TG2 estándar (forma cerrada) y la nueva TG2 de forma abierta (derivado usando inhibidores diferentes) en sueros de pacientes con enfermedad celíaca. Los valores positivos se escriben en negrita.

25

Suero	Variantes de TG2 de forma abierta					
	TG2 [U/ml]	A [U/ml]	B [U/ml]	C [U/ml]	D [U/ml]	E [U/ml]
límite	3	3	3	3	3	3
PS148	2	4	4	5	4	3
PS149	100	100	100	100	100	100
PS150	14	68	70	65	72	74
PS151	17	24	28	23	22	25
PS152	6	19	22	22	18	19
PS153	33	55	55	60	54	49
PS154	9	33	30	30	34	37
PS155	100	100	100	100	100	100
PS 158	5	18	20	17	17	17
PSE1	1	9	10	9	9	10

30

35

40 **Ejemplo 8**

Preparación de TG2 de conformación abierta biotinilada y la detección de autoanticuerpos en el suero del paciente de enfermedad celíaca.

45 **[0106]** TG2 preparada según el ejemplo 1 se ha biotinilado por incubación de 4 mg TG2 (en una solución de 2,4 mg/ml en PBS) con exceso molar de 20 veces de sulfo-NHS-biotina a 20°C durante 30 min. El exceso de sulfo-NHS-biotina se retiró usando una columna de desalación. El grado de marcado se determinó a 1,7 moléculas de biotina por TG2 (HABA-Ensayo, Pierce). En un segundo paso, TG2 biotinilada se utilizó para la preparación de TG2 de conformación abierta biotinilada, como se describe en el ejemplo 3. El recubrimiento de placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (Pierce) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

50 **[0107]** 5 sueros de donantes de sangre (DS) y los sueros del paciente 5 (PS) se han analizado para autoanticuerpos de tipo IgA utilizando las placas antes mencionadas recubiertas con TG2 abierta biotinilada. Los resultados se presentan en la tabla siguiente. La producción de TG2 de conformación abierta biotinilada y posterior inmovilización de la fase sólida recubierta con estreptavidina claramente permite la detección de autoanticuerpos en el suero del paciente de enfermedad celíaca.

55 Tabla 6: anti-IgA-ELISA utilizando la forma de TG2 abierta biotinilada en donantes sanos y sueros de pacientes con enfermedad celíaca. Los valores positivos se escriben en negrita.

60

65

Suero	Anticuerpos de TG2 abierta biotinilada (IgA)
	mOD ₄₅₀
DS1	110
DS2	153
DS3	98
DS4	178
DS5	140
PS148	201
PS149	2546
PS150	405
PS151	432
PS152	289

[0108] Los resultados dados en la Tabla 6 muestran que los títulos de auto-anticuerpos obtenidos para sueros del paciente son generalmente mucho más altos que para los sueros de donantes de sangre. Los datos se correlacionan con las señales obtenidas en el ejemplo 7. Por lo tanto, puede verse que la TG2 de forma abierta biotinilada produce títulos comparables y también puede ayudar a diagnosticar a los pacientes que tienen un título negativo en el ensayo de TG2 cerrada.

Ejemplo 9

Preparación de TG3 de forma abierta, TG6 de forma abierta y la detección de autoanticuerpos en el suero del paciente

[0109] La TG3 activada por dispsa (Zedira nº de producto T124) y TG6 (Zedira nº de producto T121) se incubaron con Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe según el ejemplo 1. Microplacas han sido recubiertas con el producto de reacción de acuerdo con el ejemplo 3. Los sueros de pacientes que sufren de enfermedad celiaca (EC), la ataxia de gluten (GA), la ataxia de gluten con enteropatía (GAE), síndrome de hombre rígido (SMS), ataxia genética (GENA), ataxia esporádica idiopática (ISA) y dermatitis herpetiforme (DH) han sido analizadas para autoanticuerpos contra TG3 (Zedira del kit, nº de producto E009), TG6 (Kits de Zedira, nº de producto E003 y E004) y con los antígenos respectivos de conformación abierta como se ha descrito anteriormente. Para las variantes de TG3 se han determinado auto-anticuerpos de tipo IgA, mientras que para las variantes de TG6, autoanticuerpos de tipo IgA e IgG se han medido. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7: anti-IgA/IgG-ELISAs usando la TG3 de forma abierta novela y la TG6 de forma abierta novela en el suero de diferentes pacientes. Los valores positivos se escriben en negrita.

ES 2 602 628 T3

		TG3	TG3 de forma abierta	TG6		TG6 de forma abierta		
		IgA [U/ml]	IgA [U/ml]	IgA [U/ml]	IgG [U/ml]	IgA [U/ml]	IgG [U/ml]	
5	suero	límite	3	3	16	30	40	60
		diagnóstico						
	PS6	CD	24	24	69	45	291	92
	PS7	GA	4	4	14	9	88	47
	PS8	CD	2	2	10	17	50	119
10	PS9	CD	1	2	10	19	41	34
	PS10	GAE	1	2	10	11	44	34
	PS11	SMS	4	4	13	5	72	34
	PS29	GA	nd	nd	18	8	73	33
15	PS30	GA	1	2	6	23	24	54
	PS31	GA	2	3	12	22	74	36
	PS32	GAE	3	7	29	22	193	63
	PS33	CD	nd	nd	31	20	82	72
20	PS34	CD	nd	nd	37	33	105	72
	PS35	GAE	16	34	100	17	300	61
	PS36	GAE	1	1	6	54	nd	nd
	PS37	GA	1	1	5	100	27	296
25	PS38	GA	3	3	17	12	74	45
	PS39	GenA	0	1	4	13	13	41
	PS40	GenA	1	1	7	11	27	35
	PS41	GenA	0	0	4	43	21	86
	PS42	GenA	0	1	4	6	15	34
30	PS43	GenA	0	1	7	13	27	32
	PS44	CD	16	17	18	100	46	236
	PS45	CD	0	0	4	22	24	174
	PS46	GA	1	1	45	8	100	46
35	PS47	ISA	1	0	64	9	135	34
	PS48	DH	12	11	8	13	44	63
	PS49	DH	70	70	4	11	29	54
	PS50	DH	29	28	18	12	55	29
40	PS51	DH	5	6	4	11	25	60
	PS52	DH	17	21	6	9	28	33
	PS53	DH	20	20	13	14	45	58
	PS54	DH	0	0	3	8	11	43
45	PS55	DH	37	29	5	8	40	40
	PS56	DH	4	3	3	15	24	54
	PS57	DH	7	6	4	8	25	38
	PS58	DH	1	1	59	14	235	71

50 [0110] Los sueros generalmente muestran los títulos comparables para TG3 cerrada, así como auto-anticuerpos de TG3 de forma abierta. Hay 4 sueros con una diferencia significativa. El suero PS31 es negativo (2U/ml) para la TG3 de forma cerrada pero positivo para la forma abierta (3 U/ml). El suero PS32 (7 U/ml) es claramente por encima del punto de corte de TG3 de forma anti-abierta, mientras que el título de la forma cerrada está en el nivel de corte. El suero PS35 tiene dos veces el título de autoanticuerpos TG3 de forma abierta para autoanticuerpos TG3. Ambos títulos son claramente positivos. El suero de PS55 tiene un título de 30% más alto para la forma cerrada, pero es claramente positivo para ambos antígenos de TG3. Por lo tanto en algunos sueros que tienen títulos negativos o bajos para autoanticuerpos contra TG3 cerrada, el uso de la TG3 de conformación abierta como antígeno puede revelar títulos más claramente positivos.

60 [0111] Con respecto a TG6, los títulos de auto-anticuerpo son generalmente mucho más altos para la forma abierta que para la forma cerrada, independientemente del tipo Ig. Otros 8 sueros negativos para TG6 muestran títulos positivos para la TG6 de conformación abierta en la IgA-ELISA. Lo mismo es cierto para los 7 sueros en IgG-ELISA. Por lo tanto el uso de TG6 en su conformación abierta ayuda a revelar auto-anticuerpos en el suero de los pacientes que no se pueden detectar con la forma cerrada como antígeno.

65 [0112] Además los datos muestran que PS11 (suero tomado de un paciente que sufre de síndrome de hombre

rígido) es positivo para el título TG6 de conformación abierta (tipo IgA). Títulos TG6 positivos abiertos también se pueden encontrar en pacientes que sufren de la enfermedad celíaca, ataxia de gluten con enteropatía, ataxia de gluten y la dermatitis herpetiforme.

5 **Ejemplo 10.**

Análisis de los sueros de pacientes que sufren de diversos trastornos utilizando kits ELISA con TG2 o TG6 en su conformación abierta y cerrada.

10 **[0113]** Kits ELISA con los antígenos TG2 (cerrada y de conformación abierta) o TG6 (cerrada y de conformación abierta se han preparado de acuerdo con los ejemplos mencionados anteriormente y los pacientes en forma de suero que sufren de diversos trastornos que han sido analizados para autoanticuerpos contra los antígenos respectivos.

15 Los pacientes sufrían de los siguientes trastornos: enfermedad de Addison (AD, insuficiencia suprarrenal crónica, que se caracteriza por la producción de anticuerpos contra las células de corticosteroides de las glándulas suprarrenales); hepatitis autoinmune (AH); polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP, la pérdida de la vaina de mielina de los nervios periféricos); la tiroiditis de Hashimoto (TH, hipotiroidismo, que se caracteriza por auto-anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea o tiroglobulina); la artritis reumatoide (RA, artritis caracterizada por autoanticuerpos que especialmente atacan el revestimiento de articulaciones y el cartílago; esclerosis múltiple (MS); polimiositis (PM, miopatía inflamatoria); colitis ulcerosa (UC); diabetes mellitus de tipo 1 (DM1, caracterizado por autoanticuerpos contra las células beta); epilepsia (EP); neuropatía (NE).

20 **[0114]** En los ejemplos mencionados se pudiera demostrar que los autoanticuerpos están presentes y en general el título de los antígenos en la conformación abierta son más altos. Especialmente en los casos de bajo título, positivo o negativo, pero cerca al límite, los antígenos de conformación abierta son beneficiosos para fines de diagnóstico. Los datos se dan en la siguiente tabla.

Tabla 8: Análisis de sueros diferentes de pacientes para autoanticuerpos contra las conformaciones cerradas y abiertas de TG3 y TG6. Los títulos positivos se escriben en negrita.

30

		TG2	TG2 de forma abierta	TG6		TG6 de forma abierta	
		IgA [U/ml]	IgA [U/ml]	IgA [U/ml]	IgG [U/ml]	IgA [U/ml]	IgG U/ml
suero	límite	3	3	16	30	40	60
	trastorno						
PS210	AD	1	6	nd	nd	nd	nd
PS223	AH	2	8	nd	nd	nd	nd
PS225	CIDP	2	15	4	0	78	34
PS214	HT	1	2	11	45	32	124
PS215	HT	1	0	15	66	53	153
PS254	MS	1	2	23	20	69	37
PS256	MS	1	0	15	23	77	45
PS257	MS	0	0	12	25	31	69
PS261	PM	2	5	nd	nd	nd	nd
PS265	UC	0	3	nd	nd	nd	nd
PS266	UC	1	14	nd	nd	nd	nd
PS267	UC	1	9	nd	nd	nd	nd
PS268	UC	2	7	nd	nd	nd	nd
PS211	DM1	3	9	nd	nd	nd	nd
PS212	DM1	1	12	nd	nd	nd	nd
PS213	DM1	2	4	nd	nd	nd	nd
PS209	EP	0	1	2	19	12	61
PS271	EP	1	1	17	27	55	72
PS272	EP	0	0	14	17	61	55
PS233	NE	1	3	15	22	36	73

60

Ejemplo 11.

Análisis de los sueros de pacientes que sufren de la enfermedad celíaca o ataxia de gluten utilizando kits de ELISA con fragmentos TG2 o TG6 en su conformación abierta y cerrada.

65

[0115] Fragmentos de transglutaminasa de tejido se producen de forma recombinante en E. coli como mutantes de

deleción que carecen de aminoácidos de C-terminal de las posiciones S538 y E447 de acuerdo con el ejemplo 1 y métodos conocidos por expertos en la técnica. Las transglutaminasas de tejido truncado resultantes eran todavía enzimáticamente activas, aunque la actividad se redujo a 5 y 1%, respectivamente, en comparación con la enzima de longitud completa. El fragmento de transglutaminasa 6 que carece de los aminoácidos C-terminal de la posición G594 fue producido en consecuencia.

[0116] La inhibición con Z-PIMen(OEt)-QPL-OMe se realizó de acuerdo con el ejemplo 1, pero a temperatura ambiente durante la noche para generar los fragmentos de forma de transglutaminasa abierta. Microplacas se han recubierto con fragmentos de transglutaminasa de forma abierta de acuerdo con el ejemplo 3. Los sueros de pacientes con enfermedad celíaca y pacientes con ataxia de gluten se han analizado. Los datos que figuran en la ficha. 9 demuestran que también los fragmentos de transglutaminasa abierta muestran títulos más altos de autoanticuerpos en comparación con la forma de longitud completa cerrada.

Tabla. 9: Análisis de sueros de paciente de enfermedad celíaca (CD) para autoanticuerpos (de tipo IgA) contra TG2, TG2 abierta y fragmentos de TG2 abierta - Δ S538 y Δ E447 y análisis de sueros de pacientes de ataxia de gluten (GA) para autoanticuerpos contra TG6, TG6 abierta y fragmento Δ G594 de TG6 abierta. Los títulos se dan en U/ml. Los títulos positivos se escriben en negrita.

Suero	trastorno	TG2	TG2 abierta	TG2 abierta Δ S538	TG2 abierta AE447	TG6	TG6 abierta	TG6 abierta Δ G594
límite		3	3	3	3	16	40	40
PS48	CD	2	4	4	3	nd	nd	nd
PS49	CD	100	100	100	100	nd	nd	nd
PS50	CD	14	68	60	45	nd	nd	nd
PS51	CD	17	24	24	19	nd	nd	nd
PS52	CD	6	19	19	22	nd	nd	nd
PS53	CD	33	55	59	51	nd	nd	nd
PSE1	CD	1	9	9	7	nd	nd	nd
PS29	GA	nd	nd	nd	nd	18	73	66
PS30	GA	nd	nd	nd	nd	6	21	28
PS31	GA	nd	nd	nd	nd	12	74	71

Ejemplo 12.

La inmovilización de TG abierta en absorbedor de polisulfona

[0117] Las fibras huecas o partículas hechas de polisulfona se proporcionan con grupos amino, como se describe en J Polym Sci, Part A: Polym Chem 41: 1316-1329, 2003, por una reacción con n-butil-litio provisto de benzonitrilo y reducción con cianoborohidruro en medio ácido para bencilamina.

La activación de los grupos de carboxilo de la TG2 de forma abierta se hizo con CME-CDI (N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetilo) carbodiimida metilo-p-toluolsulfato). Para este propósito una solución de reacción de TG2 de forma abierta y CME-CDI; 1:1 (en peso) a 4°C; en tampón 0,1 M MES (2 - (N-morfolino) ácido sulfónico de etano) preparado a pH 4,75 y se agitó durante media hora. La solución de reacción se hace pasar durante 4 horas a temperatura ambiente en la superficie de las fibras huecas aminadas. Las fibras se lavan a continuación con tampón de PBS y agua hasta neutralidad.

Un paciente se trató con un sistema de aféresis que contiene el absorbedor descrito anteriormente.

[0118] A este paciente se le había retirado sangre dos veces antes del tratamiento, con valores positivos para anticuerpos contra TG2 de forma abierta, pero no para TG2. Después de la aféresis, la señal para TG2 abierta se redujo por debajo del umbral.

Ejemplo 13.

PAGE nativa de transglutaminasas y transglutaminasas inhibidas muestra diferencias conformacionales

[0119] 2 μ g de TG2, TG2 abierta, TG3, TG3 activada por dispasa, TG3 inhibida activada por dispasa, TG6 y TG6 inhibida se han mezclado con 3x de tampón de carga (56 mM Tris-HCl pH6,8, 22,5% de glicerol, 11% de fenilo de bromuro azul) y se cargó en un gel de gradiente 4 a 20% (BioRad). 25 mM de Tris-HCl pH 8,5, 122 mM de glicina se ha utilizado como tampón de electroforesis. PAGE nativa se ha ejecutado durante 75 min y 125 V a 4°C. Tinción de Coomassie del gel reveló que TG2 migra más rápidamente que TG2 abierta, lo que indica un cambio conformacional que conduce a la migración más lenta en la PAGE nativa y que ya se ha demostrado por análisis de la estructura cristalina. TG6 y TG6 inhibida mostraron propiedades de migración comparables que TG2 y TG2 abierta, lo que indica cambios conformacionales de TG6 abierta comparables a TG2 abierta.

Activación de dispasa escinde TG3 en dos polipéptidos que no se disocian. TG3 y TG3 activada por dispasa

migraron como una sola banda. TG3 activada por Dispasa migra más lentamente que TG3 no activada. TG3 inhibida migró en dos bandas. Estos resultados muestran que la inhibición de TG3 permite la disociación de las dos subunidades, de modo que los epítomos ocultos o nuevos se hacen accesibles.

5 **Ejemplo 14: Detección de autoanticuerpos de TG6 abierta en los sueros de los pacientes que sufren de diversos trastornos utilizando una técnica ELISA que elimina las señales no específicas.**

10 **[0120]** TG6 abierta preparada según el ejemplo 9 se ha utilizado para placas de microtitulación de la capa según el ejemplo 3. Además, la mitad de las placas ha sido recubierta con tampón de recubrimiento que carece de TG6 abierta (pocillos de control de fondo: Pocillos BG). El protocolo ELISA se ha modificado mediante la medición de cada muestra dos veces en pocillos recubiertos con TG6 abierta y pocillos de BG. El valor mediano de los pocillos BG se ha restado del valor medio de los pocillos recubiertos de TG6 abierta antes de calcular las Unidades. El fondo específico de suero debido a la unión no específica a los pocillos podría eliminarse.

15 **[0121]** Los resultados se dan en la Tabla 10 y demuestran una vez más que el uso de la conformación abierta da más títulos positivos que la conformación cerrada. Además se reduce el número de muestras positivas falsas en el ensayo IgG (sueros de GenA8 y GenA16).

20 Tabla. 10: Análisis de suero de donante sano (N) y del paciente para autoanticuerpos contra TG6 y TG6 abierta en un ensayo que elimina fondo no específico. Títulos positivos se escriben en negrita. Gen R: ataxia genética; GA: ataxia de gluten; MISC: varios; ISA: ataxia esporádica idiopática; GAE: ataxia de gluten con enteropatía; GN: gluten de la neuropatía; EC: enfermedad celíaca; WMA: anomalía de sustancia blanca. La proporción de positivos se dan debajo del grupo de cada paciente.

25

	IgG			IgA	
	TG6	TG6 abierta		TG6	TG6 abierta
Límite	30	30	Límite	16	57
Controles sanos			Controles sanos		
N1	4	8	N1	6	0
N3	15	14	N3	11	56
N4	11	22	N4	5	23
N6	23	17	N6	3	0
N8	14	15	N8	9	42
N9	18	19	N9	6	9
N 10	18	22	N 10	7	79
N 12	25	18	N 12	5	30
N 13	16	25	N 13	8	29
N 14	19	23	N 14	9	42
N 15/N 11	17	13	N 15/N 11	5	7
N 17	9	9	N 17	4	14
N 18	11	10	N 18	6	33
N 19	12	11	N 19	14	55
N 20	17	9	proporción	0/14	1/14
proporción	0/15	0/15			
Ataxia genética			Ataxia genética		
GenA 1	27	24			
GenA 2	18	14	GenA 2	10	3
GenA 3	12	25	GenA 3	6	1
GenA 4	13	18	GenA 4	4	30
GenA 7	11	10	GenA 7	7	21
GenA 8	43	27	GenA 8	4	9
GenA 10	6	13	GenA 10	4	17
GenA 11	12	15	GenA 11	3	49
GenA 12	24	17	GenA 12	3	0
GenA 16	33	22	GenA 16	17	67

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 602 628 T3

(continua)

	IgG			IgA		
	TG6	TG6 abierta		TG6	TG6 abierta	
5	GenA 18	17	15	GenA 18	13	53
	GenA 20	7	12	GenA 20	8	55
	GenA 21	9	15	GenA 21	3	9
	proporción	2/13	0/13	proporción	1/13	1/13
10	Ataxia y sensibilidad al gluten		Ataxia y sensibilidad al gluten			
	GA 3	14	30	GA 3	12	49
	GA 22	>100	>100	GA 22	5	27
15	GA 24	29	44	GA 25	16	110
	GA 28/ MISC 2	27	33	GA 26	21	63
	GA 41	8	20	GA 38	5	50
	GA 43	13	30	GA 41	18	61
20	GA 50	15	31	GA 43	17	50
	GA 53	16	18	GA 49	5	38
	GA/ISA 44	12	14	GA 50	17	152
	GA/ISA 46	10	22	GA 51	6	58
25	GA/ISA 47	33	89	GA 53	6	52
	ISA 20	9	13	GA/ISA 44	4	36
	ISA 22	14	17	ISA 4	58	88
	ISA 34	4	8	ISA 9	66	79
30	GAe 1	18	31	ISA 20	58	102
	GAe 5	31	26	ISA 22	8	43
	GAe 19	60	63	ISA 29	16	62
	GAe 32	25	31	ISA 34	6	20
35	GAe 34	22	11	GAe 1pg	51	179
	GAe 35	36	15	GAe 11	14	137
	GAe 49	15	39	GAe 17	13	17
	GAe 50	8	12	GAe 31	11	76
40	GAe 51	18	19	GAe 35	17	39
	proporción	5/23	11/23	GAe 49	9	39
				GAe 51	13	123
				proporción	10/25	13/25
45	Neuropatía y sensibilidad al gluten		Neuropatía y sensibilidad al gluten			
	GN 1	44	38	GN 1	16	89
	GN 9	50	37	GN 6	38	129
50	GN 15	20	35	GN 9	46	176
	GA/GN 18	32	27	GN 10	18	74
	GN 21	10	50	GN 16	22	121
	GN 23	9	17	GN 21	17	172
55	GN 19g	>100	65	GN 23	5	75
	proporción	4/7	5/7	proporción	7/7	7/7
60	Enfermedad celíaca		Enfermedad celíaca			
	CD 13	67	72	CD 2	14	42
	CD 17	25	94	CD 3	34	29
	CD 22	18	33	CD 10	11	90
65	proporción	1/3	2/3	CD 13	90	103
				CD 17	12	32

ES 2 602 628 T3

(continua)

	IgG			IgA	
5				CD 18	10 67
				CD 22	15 49
				proporción CD/WMA 4	14 2/8 154 4/8

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico de un trastorno autoinmune, donde la forma de transglutaminasa abierta o fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta se utilizan para la detección de la presencia de autoanticuerpos específicos para la transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la INASE de transglutaminasa de forma abierta, en la que fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta son péptidos después de la reacción con un inhibidor que comprende una cadena principal, una cadena principal de péptido o un esqueleto peptidomimético y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente al grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la transglutaminasa respectiva y los fragmentos antigénicamente activos tienen una disposición de residuos de aminoácidos que forman parte de la superficie de la forma de transglutaminasa abierta expuesta a la activación de la enzima y en el que los fragmentos antigénicamente activos son capaces de provocar una respuesta de anticuerpos contra epítomos, que sólo son accesibles para los anticuerpos después de la unión de un inhibidor.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa abierta es una transglutaminasa truncada que se trunca mediante la eliminación de aminoácidos N-terminal, C-terminal o internos o péptidos en una o más posiciones con respecto a la secuencia primaria y se inhibe para convertirlo en su conformación abierta.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la forma de transglutaminasa abierta o el fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa abierta se selecciona de TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7 o factor de coagulación XIII.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el trastorno autoinmune se selecciona de la enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, polimiositis, colitis ulcerosa, trastorno de sensibilidad a la proteína de cereales, trastornos de sensibilidad al gluten, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, diabetes mellitus de tipo 1, epilepsia, dolor de cabeza con anomalías de la materia blanca, neuropatía, síndrome de persona rígida.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la forma de transglutaminasa abierta o el fragmento antigénicamente activo de la transglutaminasa de forma abierta se obtiene por reacción de la transglutaminasa de forma no abierta o el fragmento antigénicamente activo de la forma de transglutaminasa no abierta con un inhibidor.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el inhibidor comprende una cadena principal, una cadena principal de péptido o columna principal peptidomimética y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente con el grupo de tiol de la cisteína de la TG.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el inhibidor es un compuesto según la fórmula general [TG11]:
 enlace doble de aceptor-sustituido $-(CO)_m-C_2H_4$ -columna vertebral [TG11]
 en el que m significa 0 o 1 y
 el doble enlace aceptor-sustituido lleva al menos un residuo generador de electrones capaz de conjugarse con una electronegatividad $\geq 2,20$ y
 la columna principal es un péptido o peptidomimético de al menos dos aminoácidos o al menos un dipeptidomimético y/o la columna principal muestra al menos un enlace amida.
8. Transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta para su uso en la purificación de la sangre, en la que la forma de transglutaminasa abierta o fragmentos antigénicamente activos de la transglutaminasa de forma abierta se utilizan para la unión y la eliminación de autoanticuerpos específicos para la transglutaminasa de forma abierta o fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta de la sangre, en el que fragmentos antigénicamente activos de la forma de transglutaminasa abierta son péptidos después de la reacción con un inhibidor que comprende una cadena principal, una cadena principal de péptido o un esqueleto peptidomimético y un grupo reactivo de tiol capaz de formar un enlace covalente al grupo de tiol de la cisteína en el sitio activo de la transglutaminasa respectiva o los fragmentos antigénicamente activos tienen una disposición de residuos de aminoácidos que forman parte de la superficie de la forma de transglutaminasa abierta expuesta a la activación de la enzima y donde los fragmentos antigénicamente activos son capaces para provocar una respuesta de anticuerpos contra epítomos, que sólo son accesibles para los anticuerpos después de la unión de un inhibidor.
9. El uso de la forma abierta de una TG para la preparación de una composición farmacéutica para la hiposensibilización de un paciente que sufre de un trastorno autoinmune causado por una intolerancia al gluten.

10. La preparación farmacéutica que contiene una TG de forma abierta, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o diluyente para uso en terapia.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

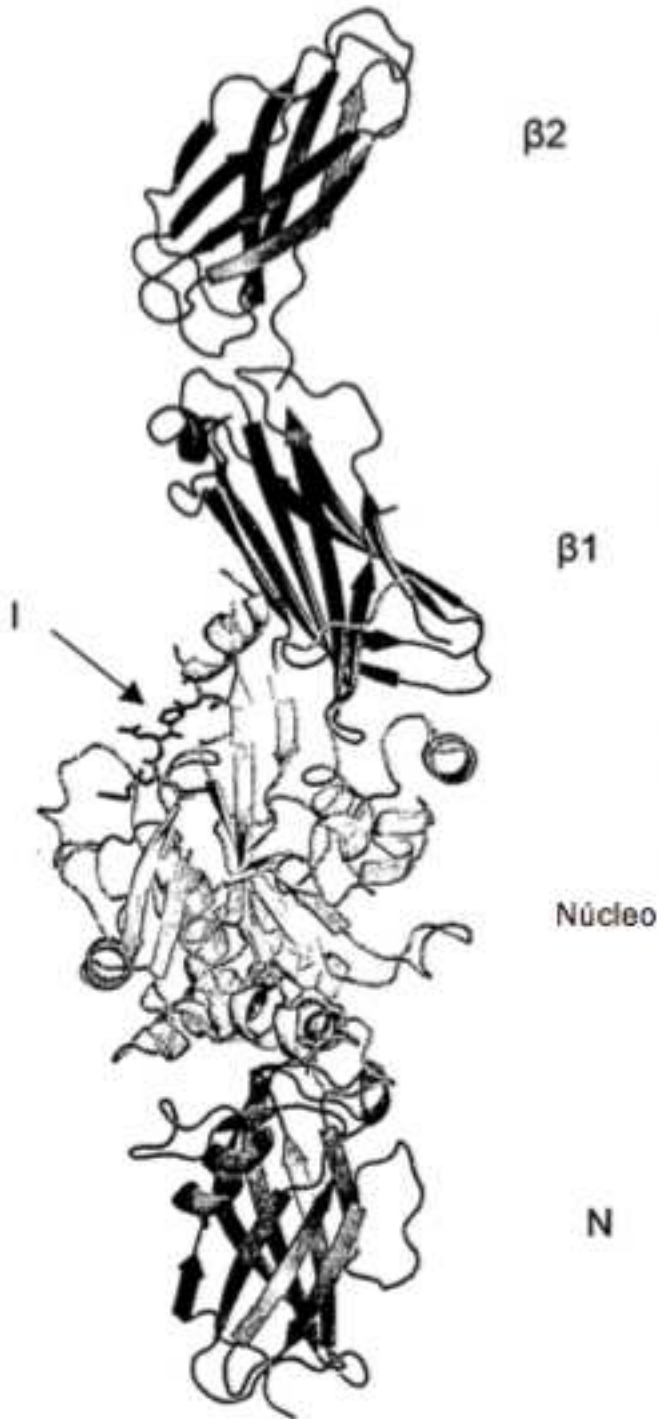


Figura 2

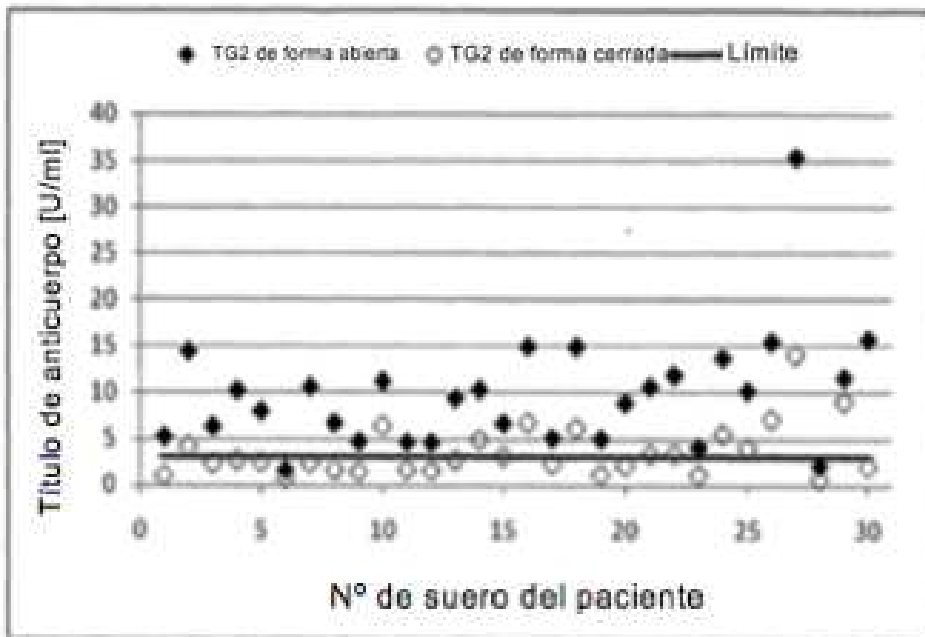


Figura 3

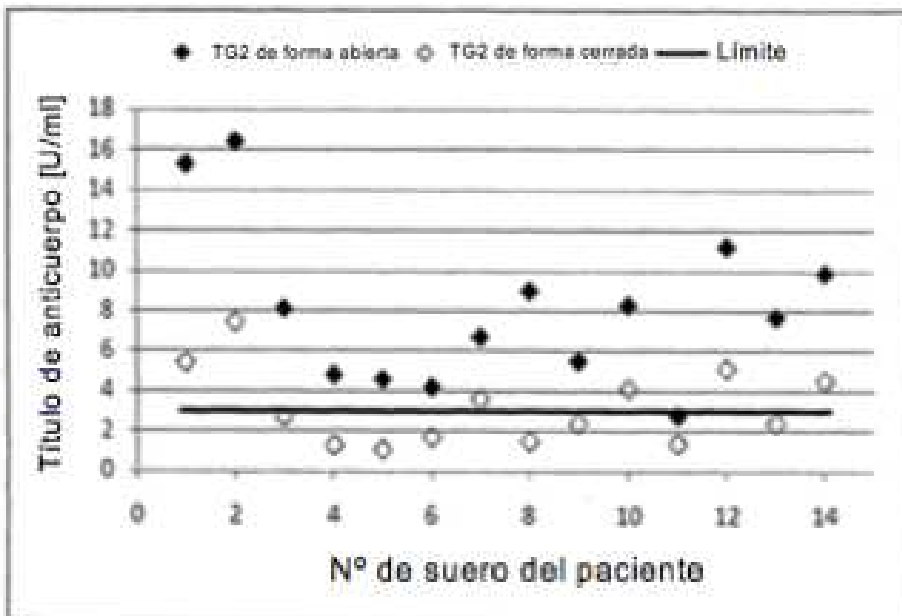


Figura 4

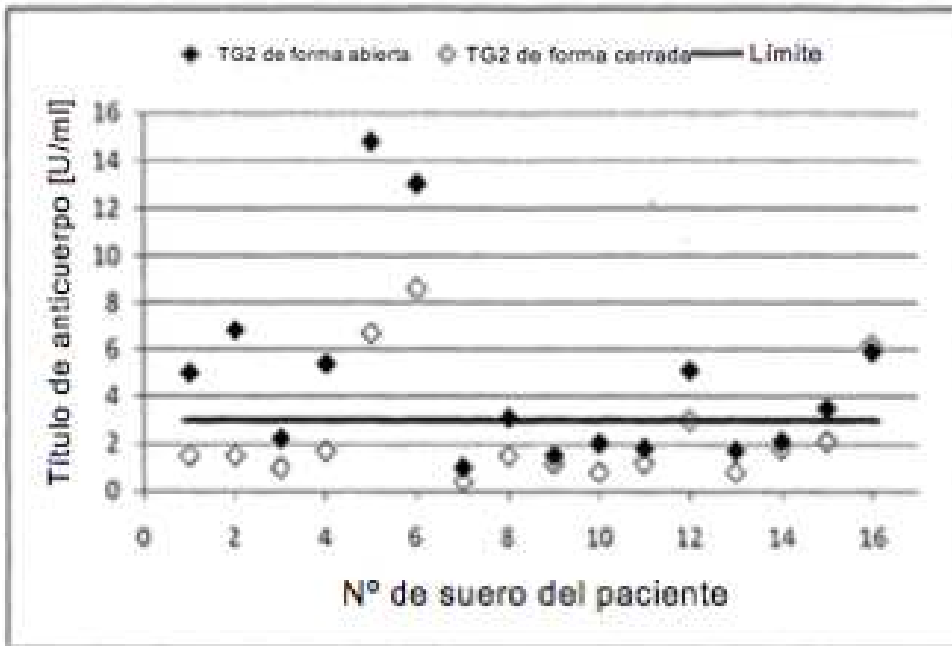


Figura 5

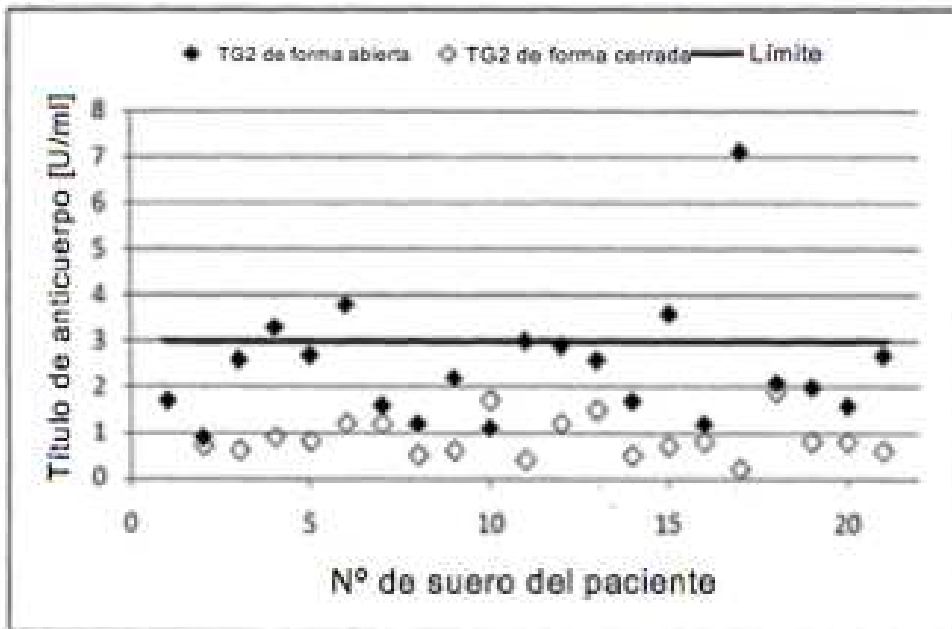


Figura 6

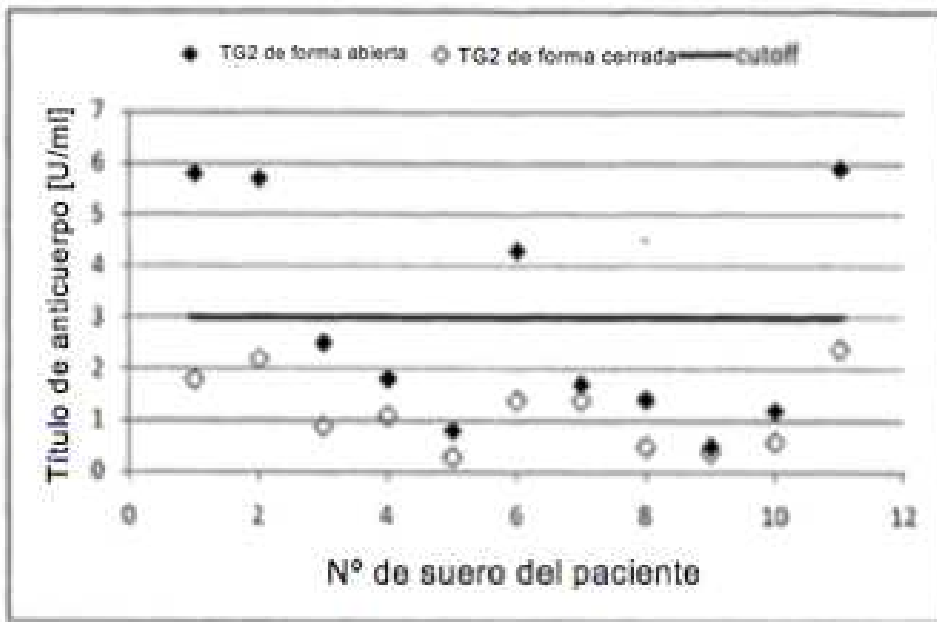


Figura 7

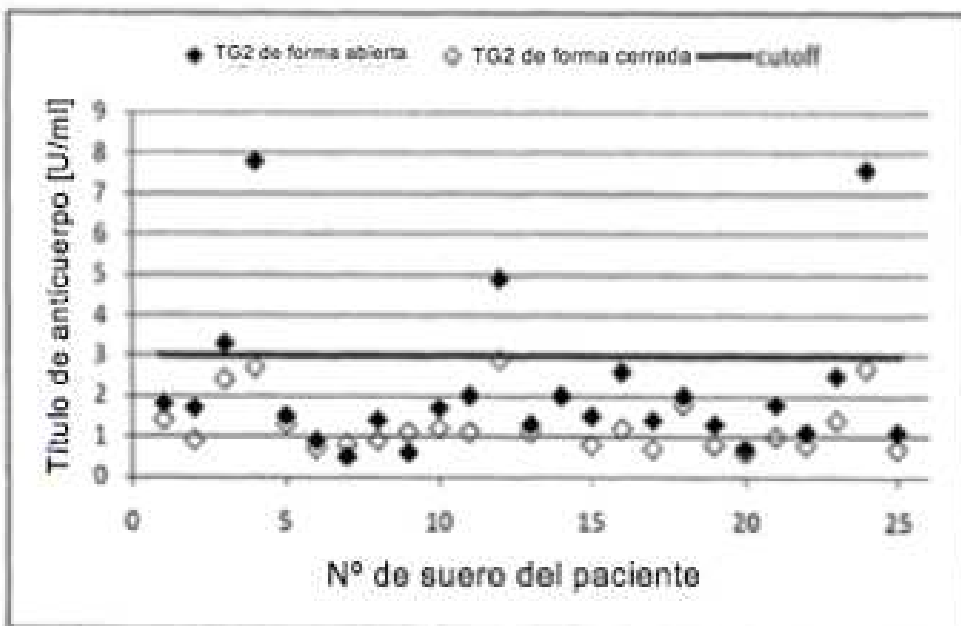


Figura 8

