

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 715**

21 Número de solicitud: 201430198

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 17/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

14.02.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.06.2014

Fecha de la concesión:

11.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
(100.0%)
Campus Universitari s/n (Att.Xavier Vallvé)
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Valles)
(Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**PIVIDORI GURGO, María Isabel y
KERGARAVAT, Vanessa Silvana**

54 Título: **Péptido, péptido magnético y método para detectar la enfermedad celíaca**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un péptido, a un péptido magnético y a un método para detectar la enfermedad celíaca. También se refiere a un péptido deaminado que se emplea para preparar dicho péptido magnético, y al empleo de ambos para la detección de la enfermedad celíaca. Dicho péptido deaminado comprende una cola de histidinas y está unido a un complejo magnético particulado. También se refiere a un inmunosensor que comprende dicho péptido magnético, a un método apropiado para detectar la enfermedad celíaca basado en un inmunoensayo magnético y a un kit que comprende dicho péptido magnético.

ES 2 465 715 B1

DESCRIPCIÓN

PÉPTIDO, PÉPTIDO MAGNETICO Y MÉTODO PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD CELÍACA

5

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un método para la detección de la enfermedad celíaca mediante el empleo de un péptido inmovilizado sobre partículas magnéticas.

10

Estado de la técnica anterior

La Enfermedad Celíaca (EC) es una forma de enteropatía que afecta a individuos genéticamente predispuestos, al entrar en contacto con alimentos que contienen gluten. Ello determina la aparición de una lesión histológica característica, que en las formas más graves provoca atrofia de las vellosidades intestinales. Como consecuencia de ello, puede producirse un defecto de malabsorción de nutrientes (principios inmediatos, sales minerales y vitaminas) que conduce a diversos estados carenciales responsables de un amplio espectro de manifestaciones clínicas como osteomalacia (reblandecimiento de huesos por pérdida de sales calcáreas), úlceras digestivas y procesos malignos como neoplasia gastrointestinal.

15

20

La EC puede presentarse a cualquier edad de la vida y cursa con manifestaciones clínicas muy variadas, aunque en muchos casos la enfermedad es asintomática. Estas premisas hacen especialmente relevante el papel del pediatra y del médico de familia en atención primaria en el diagnóstico precoz, evitando así el desarrollo de complicaciones graves a largo plazo.

25

La EC consiste en una intolerancia permanente a las proteínas del gluten del trigo (gliadina), del centeno (secalina), de la cebada (hordeina) y del triticale (híbrido de trigo y centeno).

30

A pesar de que esta enfermedad fue considerada rara en muchos países europeos, la disponibilidad de ensayos serológicos sensibles no invasivos han permitido detectar la enfermedad celíaca en la población en general.

35

La prevalencia mundial se estima en 1/266, y en España oscila entre 1/118 en la población infantil y 1/389 en la población adulta. Sin embargo, se considera que la epidemiología de la EC tiene las características de un iceberg ya que esta prevalencia podría ser mucho mayor, puesto que un porcentaje importante de

casos permanece sin detectar. Se estima que por cada paciente diagnosticado se encuentran entre 5 y 10 que no lo son. Así, según diversos estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo, la EC sin sintomatología clásica es más frecuente que la forma sintomática, constituyendo un reto para el sistema sanitario su detección precoz.

5 Inicialmente, la detección de la enfermedad celíaca se basaba en un ensayo de malabsorción mediante el empleo de D-xilosa. Posteriormente se empezaron a utilizar ensayos serológicos para anticuerpos anti-gliadina (AGA) y anticuerpos anti-endomisio (EMA). Más adelante se incorporó la detección de los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular 2 (ATG₂) y, más recientemente, de los anticuerpos anti-péptidos deaminados de gliadina (APDG).

10 Los marcadores séricos son de gran utilidad como indicadores de EC, si bien la biopsia intestinal sigue siendo el método definitivo para establecer el diagnóstico. Dichos marcadores ayudan a seleccionar a los individuos con mayor probabilidad de presentar la EC, siendo particularmente útiles en aquéllos sin síntomas gastrointestinales, en aquellos con enfermedades asociadas a la EC y para el control de familiares de primer grado de enfermos diagnosticados. Debe considerarse, no obstante, que la negatividad de estos marcadores no excluye definitivamente el diagnóstico, siendo necesario en ocasiones recurrir a pruebas más avanzadas (estudio genético) cuando la sospecha diagnóstica es elevada.

15 Los anticuerpos anti-gliadina (AGA) fueron los primeros en utilizarse, tal como se describe en Stern *et al.*, *Validation and standardization of serological screening tests for coeliac disease in 1996*, 3rd EMRC/ESPGAN Workshop, Dec. 5-8, 1996, Molsheim, Francia, pág. 9-24. Son tanto de clase IgA como IgG. Se utilizan preferentemente los de clase IgA y su eficacia para el cribado de EC es mayor en niños que en adultos.

20 Los anticuerpos anti-endomisio (EMA) son también de clase IgA. Su sensibilidad y su especificidad son variables según la edad. Según el documento Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2008, (NIPO: 351-08-086-X), dichos anticuerpos tienen el inconveniente de la laboriosidad de su determinación y su interpretación es subjetiva. Además, es conocido que algunos pacientes de la EC presentan un déficit de IgA, por lo que dichos pacientes darían negativos con este test.

25 Los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular humana de clase IgA (ATG₂) se consideran marcadores sensibles, específicos y muy útiles tanto para el

35

diagnóstico como el seguimiento de la EC. También se han divulgado otras alternativas como los anticuerpos combinados ATG₂-IgA/IgG.

En el estado de la técnica se han descrito diversos métodos en los que se emplean los anticuerpos ATG₂. Por ejemplo, en el artículo Kergeravat *et al.*, *Magneto immunofluorescence assay for diagnosis of celiac disease*, Anal. Chim Acta., 2013, 798, 89-96 se describe un método para el diagnóstico de la EC basado en la detección de anticuerpos anti-ATG₂ mediante el uso de la enzima ATG₂ inmovilizada en partículas magnéticas y la detección se realizó por inmunofluorescencia. Se describe que dicho ensayo presentó una sensibilidad del 96,6% y una especificidad del 89,5%, y una eficiencia del 93,8% comparado con el kit comercial ELISA.

Para evitar la toma de muestras de sangre también se ha divulgado la detección de anticuerpos ATG₂ en saliva como, por ejemplo, en la solicitud de patente norteamericana US-A-2008/0038760.

Posteriormente, tal como se describe en Aleanzi *et al.*, *Antibody Recognition against Native and Selectively Deamidated Gliadin Peptides*, Clin. Chem., 2001, 47, 2023–2028, se comenzó a estudiar la relación entre la enfermedad celíaca y los APDG del isotipo IgG e IgA, ya que en la enfermedad celíaca, los péptidos de gliadina ingeridos en la dieta son selectivamente deaminados en el intestino por la enzima TG₂, de modo que la glutamina, H₂NCOCH₂CH(NH₂)COOH, es transformada por dicha enzima en ácido glutámico, HOOCCH₂CH(NH₂)COOH. Esta deaminación selectiva puede ser el evento que inicia la respuesta inmune al gluten en individuos predispuestos genéticamente. En Schwertz *et al.*, *Serologic Assay Based on Gliadin-Related Nonapeptides as a Highly Sensitive and Specific Diagnostic Aid in Celiac Disease*, Clin. Chem., 2004, 50, 2370–2375, se describen nonapéptidos derivados de gliadina que son reconocidos por los anticuerpos de pacientes con la ED. También se describe que ninguno de los octadecapéptidos deaminados ensayados fue mejor epitopo que los péptidos de cadena más corta.

En el estado de la técnica se han descrito métodos para detectar estos anticuerpos APDG. Dichos métodos se basan en ensayos ELISA con detección óptica como, por ejemplo, el descrito en Sakly *et al.*, *Performance of anti-deamidated gliadin peptides antibodies in celiac disease diagnosis*, Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol., 2012, 36, 598-603, o un ensayo inmunofluorimétrico como el descrito en Ankelo *et al.*, *Antibody responses to deamidated gliadin peptide show high specificity and parallel antibodies to tissue transglutaminase in developing coeliac disease*, Clin. Exp. Immunol., 2007, 150, 285–293.

5 En el estado de la técnica se siguen divulgando nuevos métodos para la detección de la EC. Por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO-A-2009/131909 se describe un método para detectar la EC en un individuo en el que se emplea un antígeno formado por una gliadina recombinante deaminada unida a una cola tal como la proteína glutationa-S-transferasa o His-tag, que puede incluir transaminasa tisular. Dicho antígeno se encuentra inmovilizado en partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo.

10 Recientemente, en la solicitud de patente internacional WO-A-2013/083866, se ha descrito el empleo de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en el diagnóstico y el seguimiento de la EC mediante el análisis de una muestra de sangre del paciente.

15 A pesar de las soluciones descritas en el estado de la técnica, persiste la necesidad de proporcionar un método simple, rápido y con una selectividad y especificidad mejoradas para detectar la enfermedad celíaca y superar, al menos en parte, los inconvenientes que presentan los métodos del estado de la técnica.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un péptido.

20 Forma también parte del objeto de la invención un péptido magnético que comprende dicho péptido y un complejo magnético particulado.

También forma parte del objeto de la invención un inmunosensor que comprende dicho péptido magnético.

25 También forma parte del objeto de la invención un método para detectar la enfermedad celíaca.

30 Forma parte también del objeto de la invención el uso de dicho péptido para detectar la enfermedad celíaca.

También forma parte del objeto de la invención el uso de dicho péptido magnético para detectar la enfermedad celíaca.

También forma parte del objeto de la invención el uso de dicho inmunosensor para detectar la enfermedad celíaca.

35 Forma parte también del objeto de la invención un kit para detectar la enfermedad celíaca.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un péptido lineal que responde a la fórmula general (I):



en donde:

X es Q o E indistintamente, y al menos un X es E, y

en donde:

n está comprendido entre 2 y 20, y m es 0, o

m está comprendido entre 2 y 20, y n es 0.

Dicho péptido resulta apropiado para ser empleado en un método para la detección de la EC una vez inmovilizado con un complejo magnético particulado.

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para detectar la enfermedad celíaca en el que se emplea como antígeno el péptido de fórmula general (I) inmovilizado sobre un complejo magnético particulado, y que, sorprendentemente, permite una detección con una elevada sensibilidad y especificidad y, además, se trata de un método simple y rápido.

Las abreviaturas empleadas para los aminoácidos en esta descripción siguen la normativa de la Comisión para la Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB, según se describe en el artículo *Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides*, Pure & Appl. Chem., 1984, 56(5), 595-624. De esta forma H es L-histidina, L es L-leucina, F es L-fenilalanina, P es L-prolina, Q es L-glutamina y E es ácido glutámico.

En la presente descripción, así como en las reivindicaciones, las formas singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Péptido

El péptido de la invención responde a la fórmula general (I):



en donde:

X es Q o E indistintamente, y al menos un X es E, y

en donde:

n está comprendido entre 2 y 20, y m es 0, o

m está comprendido entre 2 y 20, y n es 0.

Dichos péptidos, definidos por las secuencias SEQ_ID_NO: 1 a 38, derivan de péptidos deaminados de gliadina a los que se ha añadido una cola de entre

2 y 20 histidinas (H) en el extremo *N*-terminal, donde se encuentra el grupo amino (NH₂) o en el extremo *C*-terminal, donde se encuentra el grupo carboxilo (COOH), preferiblemente *n* y *m* están comprendidas entre 4 y 15, más preferiblemente entre 6 y 10 y aún más preferiblemente entre 6 y 8.

5 Más preferiblemente el péptido de la invención responde a la fórmula general (I), en donde *m* es cero (0) y *n* está comprendida 2 y 20, más preferiblemente entre 4 y 15, más preferiblemente entre 6 y 10 y aún más preferiblemente entre 6 y 8.

10 De forma más preferida, el péptido de la invención responde a la estructura H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39), donde *n* es 6.

En el artículo de Schwertz *et al.*, ya mencionado, se describen 12 octadecapéptidos deaminados, sin cola de histidinas, que vienen definidos por las secuencias siguientes:

Péptido deaminado	SEQ_ID_NO:
H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH	40
H ₂ N-LPFPQQPEQPFPQPEQPQ-COOH	41
H ₂ N-LPFPEQPQQPFPQPEQPQ-COOH	42
H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPQQPQ-COOH	43
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPQQPE-COOH	44
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPQEPQ-COOH	45
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPEQPQ-COOH	46
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPEPQQPQ-COOH	47
H ₂ N-LPFPQQPQEFPQPQQPQ-COOH	48
H ₂ N-LPFPQQPEQPFPQPQQPQ-COOH	49
H ₂ N-LPFPQEPPQPFPQPQQPQ-COOH	50
H ₂ N-LPFPEQPQQPFPQPQQPQ-COOH	51

35 Dichos péptidos modificados convenientemente con una cola de histidina también son apropiados para ser empleados en el método de la invención.

Preferiblemente, comprenden de entre 2 y 20 histidinas (H) en el extremo N-terminal, esto es n está comprendida entre 2 y 20 y m es cero (0), o en el extremo C-terminal, esto es m está comprendida entre 2 y 20 y n es cero (0), preferiblemente n y m están comprendidas entre 4 y 15, más preferiblemente entre 6 y 10 y aún más preferiblemente entre 6 y 8. Más preferiblemente dichos péptidos comprenden una cola de histidinas en donde m es cero (0) y n está comprendida 2 y 20, más preferiblemente entre 4 y 15, más preferiblemente entre 6 y 10 y aún más preferiblemente entre 6 y 8.

En el artículo de Ankelo *et al.*, ya mencionado, se describen dos derivados del péptido definido por la fórmula (SEQ_ID_NO_ 40), sin cola de histidinas. Uno de ellos está modificado con biotina en el extremo N-terminal, y en el otro en el extremo C-terminal, habiéndose incluido un residuo adicional de lisina para facilitar la incorporación de la biotina, H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQK-COOH (SEQ_ID_NO: 52). La incorporación de la biotina en dichos péptidos se debe al empleo de placas recubiertas con la proteína estreptavidina, que forma un complejo de afinidad muy fuerte con la biotina, y así se inmoviliza el péptido.

Los péptidos descritos en la invención están formados por entre 20 y 38 aminoácidos que los hace apropiados para ser preparados empleando los procedimientos habituales de síntesis de péptidos en fase sólida como, por ejemplo, los descritos por R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154. También pueden adquirirse comercialmente como, por ejemplo, a las compañías Eurogentec, S.A. (Seraing, Bélgica) o GenScript (Piscataway, EE.UU.).

Péptido magnético

También forma parte del objeto de la invención un péptido magnético que comprende:

- a) el péptido de fórmula general (I):



en donde:

X es Q o E indistintamente, y al menos un X es E, y

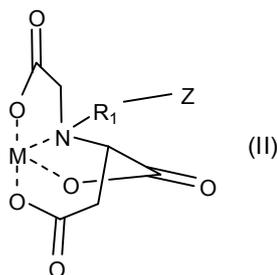
en donde:

n está comprendido entre 2 y 20, y m es 0, o

m está comprendido entre 2 y 20, y n es 0, y

- b) un complejo magnético particulado de fórmula general (II):

5



en donde:

Z es una partícula polimérica magnética unida covalentemente al ligando aspartato carboximetilado a través de R_1 ,

10 R_1 es un brazo de unión que conecta el átomo de nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado con la partícula polimérica magnética Z, y

M es un ion de un metal de transición con un número de coordinación 6.

15 El péptido de la invención se encuentra inmovilizado sobre una partícula polimérica magnética (en adelante PM) por medio de la cola de histidina que forma complejos con el metal de transición, y así se completa la esfera de coordinación de dicho metal. De acuerdo con las divulgaciones del estado de la técnica, por ejemplo, la patente norteamericana US5962641, el complejo de coordinación formado entre un

20 péptido que contiene una cola de histidina y el metal de transición se puede clasificar como muy fuerte. En el contexto de esta invención se considera que la unión del péptido con el metal de transición se trata sustancialmente de un complejo de coordinación, que no incluye enlaces covalentes.

25 Eventualmente el complejo magnético particulado incluye contracciones, por ejemplo, Na^+ o Li^+ , para compensar las cargas negativas en exceso del ligando aspartato carboximetilado que forma parte del mismo.

Partícula polimérica magnética

30 En el contexto de la invención se entiende por partícula polimérica magnética (PM) una partícula formada por un polímero que contiene una sustancia superparamagnética. De este modo las PM son desplazables por el efecto de un campo magnético, pero no son magnetizables permanentemente.

35 Se entiende por partícula polimérica magnética funcionalizada aquella PM que incluye grupos funcionales situados preferiblemente en la superficie de la misma que permiten el anclaje ulterior de otras moléculas.

Las PM están formadas habitualmente a partir de combinaciones de polímeros vinílicos (per ejemplo, estireno), acrilatos y/o metacrilatos. El polímero puede estar reticulado mediante la incorporación de agentes reticulantes como comonomeros, por ejemplo, divinilbenceno o dimetacrilato de etilenglicol. Preferiblemente el polímero es un polimérico estirénico reticulado, por ejemplo, un polímero formado por estireno y divinilbenceno, y que se encuentra funcionalizado en la superficie del mismo, o bien un polímero (met)acrílico reticulado funcionalizado en la superficie con un comonomero que contiene, por ejemplo, un grupo epoxi. El experto en la materia no encuentra dificultades para determinar las cantidades apropiadas de cada uno de los monómeros implicados en la formación de las partículas poliméricas. Por ejemplo, en la solicitud de patente WO-A-00/61647 se describen procedimientos para la preparación de partículas poliméricas, que pueden incluir materiales magnéticos, entre otros.

La funcionalización de la superficie de las partículas poliméricas permite obtener PM funcionalizadas que facilitan el acoplamiento del ligando aspartato carboximetilado a dichas partículas. Dicha funcionalización puede llevarse a cabo mediante la incorporación de, por ejemplo, grupos carboxilo, nitro, amino, tosilo, epoxi, o tiol. A menudo, las PM funcionalizadas son preparadas a partir de polímeros de estireno que son nitrados para introducir un grupo nitro en la superficie de las mismas. La reducción del grupo nitro a grupo amino por medios convencionales permite disponer de PM funcionalizadas con grupos amino que fácilmente pueden reaccionar con otros grupos, por ejemplo, haloderivados.

Como sustancia superparamagnética se pueden emplear óxidos de hierro como, por ejemplo, la magnetita (Fe_3O_4). Se han descrito diferentes procedimientos para la preparación de PM como, por ejemplo, el que se encuentra en la patente US4654267.

Las PM de la invención tienen típicamente un diámetro medio comprendido entre 0,3 y 100 micras, preferiblemente entre 0,5 y 50 micras, más preferiblemente entre 0,8 y 8 micras, y aún más preferiblemente entre 0,8 y 1,2 micras.

Habitualmente las PM son sustancialmente esféricas y sustancialmente monodispersas. Se entiende por sustancialmente monodispersas que para una pluralidad de partículas, las mismas tienen un coeficiente de variación (CV) de menos del 20%, preferiblemente menos del 15%, más preferiblemente menos del 10%, y más preferiblemente no más del 8%, por ejemplo, entre 2 y 5%. El coeficiente de variación se determina en porcentaje como $\text{CV} = (100 \times \text{desviación estándar})/\text{media}$.

Debido a su pequeño tamaño y geometría sustancialmente esférica, un gran número de biomoléculas pueden ser inmovilizadas sobre la superficie de estas PM funcionalizadas. La utilización de estas partículas presenta una serie de ventajas, entre las que se pueden destacar: la mejora de la sensibilidad del ensayo, la
5 disminución del posible efecto matriz de la muestra, evitar etapas complejas de pretratamientos, la reducción de los tiempos de reacción y la posibilidad de manipularlas en diferentes plataformas mediante la aplicación de un campo magnético permanente, como por ejemplo en la superficie del electrodo de trabajo o en una placa de microtitulación.

Ligando aspartato carboximetilado

El ligando aspartato carboximetilado se emplea habitualmente en la purificación de proteínas mediante la técnica de cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (en inglés IMAC), tal como se describe, por ejemplo, en la
15 solicitud de patente WO-A-98/06739.

El ligando aspartato carboximetilato está unido covalentemente a la partícula polimérica magnética Z a través del brazo de unión R₁.

Dicha unión puede efectuarse por medio de diferentes procedimientos. Por ejemplo, puede efectuarse por reacción entre un grupo electrófilo del ligando funcionalizado (por ejemplo, un haloalquileo, o un grupo alquilenocarboxílico) y un
20 grupo nucleófilo de Z (por ejemplo, un grupo amino, aminoalquileo, hidroxil, hidroxialquileo, tiol, o tioalquileo). También puede efectuarse por reacción entre un grupo nucleófilo del ligando funcionalizado (por ejemplo, un grupo aminoalquileo, hidroxialquileo, o tioalquileo) y un grupo electrófilo de Z (por ejemplo, un grupo
25 haloalquileo, o un grupo carboxílico). Preferiblemente la reacción se efectúa entre el ligando modificado con un grupo nucleófilo y un grupo electrófilo de Z, tal como se describe, por ejemplo, en los ejemplos de la solicitud de patente WO-A-2005/089933. Para ello el ligando puede ser funcionalizado introduciendo un grupo nucleófilo, como el grupo amino, para que pueda reaccionar con un grupo electrófilo de la partícula Z,
30 por ejemplo, un grupo metileno que incluye un átomo de halógeno como el bromo. El grupo reactivo de la partícula Z se encuentra preferiblemente en la superficie de la misma y es el resultado de la funcionalización del polímero que constituye dicha partícula tal como se ha expuesto anteriormente.

Preferiblemente el grupo R₁, que es el brazo de unión entre el átomo de
35 nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado y la superficie de la partícula, consta

de una cadena de entre 3 y 20 átomos, más preferiblemente de entre 5 y 20 átomos, y aún más preferiblemente de entre 6 y 20 átomos. El brazo de unión R_1 entre el átomo de nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado y la partícula Z, se selecciona preferiblemente de entre -alquileo-NH-, -alquileo-CO-NH-, -alquileo-NH-CO-, -
 5 -alquileo-O-, -alquileo-CO-O-, -alquileo-O-CO-, -alquileo-S-, -alquileo-CO-S-, -alquileo-S-CO-, -alquileo-NH-alquileo- R_2 , -alquileo-NH-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-NH-alquileo- R_2 , -alquileo-O-alquileo- R_2 , -alquileo-O-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-O-alquileo- R_2 , -alquileo-S-alquileo- R_2 , -alquileo-S-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-S-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-NH-, -hidroxialquileo-CO-NH-, -hidroxialquileo-NH-CO-, -hidroxialquileo-O-, -hidroxialquileo-CO-O-, -hidroxialquileo-O-CO-, -hidroxialquileo-S-, -hidroxialquileo-CO-S-, -hidroxialquileo-S-CO-, -hidroxialquileo-NH-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-NH-CO-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-CO-NH-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-O-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-O-CO-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-CO-O-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-S-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-S-CO-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-CO-S-alquileo- R_2 , -alquileo-NH-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-NH-CO-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-CO-NH-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-O-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-O-CO-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-CO-O-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-S-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-S-CO-hidroxialquileo- R_2 , y -alquileo-CO-S-hidroxialquileo- R_2 , en donde R_2 es un grupo funcional de enlace y preferiblemente es O, S o NH, y más preferiblemente es NH.

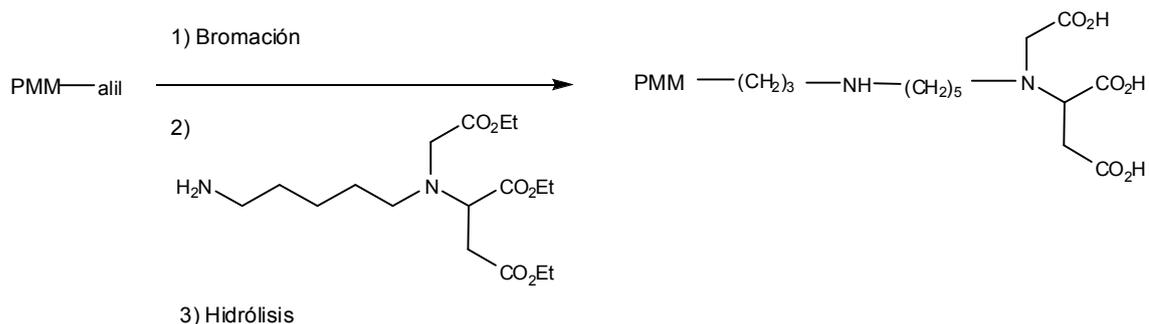
Más preferiblemente R_1 se selecciona de entre -alquileo-NH-, -alquileo-CO-NH-, -alquileo-NH-CO-, -alquileo-O-, -alquileo-CO-O-, -alquileo-O-CO-, -alquileo-NH-alquileo- R_2 , -alquileo-NH-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-NH-alquileo- R_2 , -alquileo-O-alquileo- R_2 , -alquileo-O-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-O-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-NH-, -hidroxialquileo-CO-NH-, -hidroxialquileo-NH-CO-, -hidroxialquileo-O-, -hidroxialquileo-CO-O-, -hidroxialquileo-O-CO-, -hidroxialquileo-NH-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-NH-CO-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-CO-NH-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-O-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-O-CO-alquileo- R_2 , -hidroxialquileo-CO-O-alquileo- R_2 , -alquileo-NH-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-NH-CO-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-CO-NH-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-O-hidroxialquileo- R_2 , -alquileo-O-CO-hidroxialquileo- R_2 , y -alquileo-CO-O-hidroxialquileo- R_2 . Aún más preferiblemente R_1 se selecciona de entre -alquileo-NH-alquileo- R_2 , -alquileo-NH-CO-alquileo- R_2 , -alquileo-CO-

NH-alquileo-R₂, -alquileo-O-alquileo-R₂, -alquileo-O-CO-alquileo-R₂, y -alquileo-CO-O-alquileo-R₂; todavía más preferiblemente de entre -alquileo-NH-alquileo-R₂, y -alquileo-O-alquileo-R₂; aún más preferiblemente es -alquileo-NH-alquileo-R₂, en donde R₂ es un grupo funcional de enlace y preferiblemente es O, S o NH, y más preferiblemente es NH. Aún más preferiblemente R₁ es el grupo -(CH₂)_x-NH-(CH₂)_y-NH, en donde x e y están comprendidos entre 1 y 6, más preferiblemente entre 3 y 5, en donde el grupo (CH₂)_x se encuentra unido al átomo de nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado, y el grupo NH situado a la derecha es el que se encuentra unido a la partícula polimérica magnética Z.

El metal de transición

El metal de transición M con un número de coordinación 6 se selecciona preferiblemente de entre el grupo formado por Ni, Fe, Ga, Mn, Co, Cu y Zn, más preferiblemente por Ni, Fe, Mn y Co, y más preferiblemente Co. El ion del metal de transición M tiene preferiblemente un estado de oxidación de +2 o +3, más preferiblemente es +2. De forma particularmente preferida el ion del metal de transición es Co⁺². En la partícula polimérica magnética de fórmula (II) el metal M está complejado por los tres grupos carboxilato y el grupo amino del ligante aspartato carboximetilado. Para la formación del complejo entre el metal de transición y el ligando aspartato carboximetilado se pueden emplear métodos bien conocidos por el experto en la materia como, por ejemplo, exponiendo una sal del metal al ligando. Por ejemplo, se puede preparar suspendiendo las partículas poliméricas magnéticas que comprenden el ligando en agua y añadiendo a dicha suspensión una solución de una sal del metal correspondiente. Entre otras, pueden emplearse las siguientes sales: CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, GaCl₂, GaCl₃, MnSO₄, NiCl₂, o ZnCl₂.

Un complejo magnético particulado particularmente preferido es el descrito en el Ejemplo 4 de la solicitud de patente WO-A-2007/089933. En dicho ejemplo se cargan con cloruro de cobalto (II) unas PM que comprenden el ligando carboximetil aspartato y que se obtienen de acuerdo con el siguiente proceso: se hacen reaccionar partículas magnéticas de estireno funcionalizadas con grupos alilo con un agente de bromación, a continuación se hacen reaccionar dichas partículas bromadas con el *N*-aminopentil-*N*-etoxicarboximetilaspartato de dietilo, y finalmente se hidrolizan los grupos éster. Dicha secuencia de reacciones se visualiza en el siguiente esquema:



10

Los complejos magnéticos particulados que forman parte del péptido magnético de la invención se pueden preparar empleando procedimientos análogos a los descritos anteriormente, o bien se pueden adquirir comercialmente a través de las compañías Clontech, Invitrogen Dynal, Merck Millipore. Especialmente preferidos son los complejos magnéticos particulados denominados *Dynabeads*[®] *TALON*[®] que pueden obtenerse comercialmente a través de la compañía Invitrogen Dynal (Oslo, Noruega), y que responden al complejo magnético particulado obtenido en el Ejemplo 4 de la

15

solicitud de patente WO-A-2007/089933.

El péptido magnético se obtiene por inmovilización del péptido de la invención sobre el complejo magnético particulado.

20

Dicha inmovilización se puede efectuar, por ejemplo, empleando las condiciones descritas por el fabricante para el producto *Dynabeads*[®] *TALON*[®], por ejemplo, en el apartado de Manuales y Protocolos de la página web <http://lifetechnologies.com/>, o en el folleto técnico del mismo. Se trata de un proceso de incubación del péptido con dicho complejo magnético particulado en el seno de un tampón de inmovilización formado por fosfato de sodio 0,05 M, pH 8, NaCl 0,3 M, y 0,01 % de Tween[®] 20 (monolaurato de sorbitán con 20 moles de óxido de etileno) durante un período de tiempo de unos 10 minutos a una temperatura de 25° C.

25

La eficiencia de la inmovilización para obtener el péptido magnético de la invención es prácticamente cuantitativa.

30

En una realización particularmente preferida el péptido magnético de la invención comprende el péptido definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 39, Z son partículas magnéticas de poliestireno, R₁ es el grupo -(CH₂)₅-NH-(CH₂)₃-NH, y M es Co²⁺, en donde el grupo (CH₂)₅ se encuentra unido al átomo de nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado, y el grupo NH situado a la derecha es el que se encuentra unido a la partícula polimérica magnética Z.

35

Inmunosensor

Forma parte de la invención un inmunosensor que comprende el péptido magnético de la invención y un transductor que tiene acoplado o integrado un imán.

5 En general, un inmunosensor consta de un elemento de reconocimiento biológico (antígeno o anticuerpo) y un transductor (electroquímico: potenciométrico, amperométrico o conductimétrico; óptico; piezoeléctico; termométrico; magnético; micromecánico). Algunos de ellos se encuentran definidos como directos, en los cuales se detecta un cambio físico durante la formación del complejo y otros como indirectos, en los cuales la señal es generada por un marcador (generalmente es enzimático).

10 En el marco de la invención el transductor preferiblemente es electroquímico u óptico. En una realización preferida el método se lleva a cabo mediante el empleo de un inmunosensor que comprende un transductor electroquímico al que se le ha incluido un imán.

15 En este caso concreto, las medidas electroquímicas, basadas en tres tipos de señales analíticas (potencial, corriente y carga), se realizan en una celda electroquímica constituida por dos o más electrodos y asociados electrónicamente para controlar y medir el potencial y la corriente. En el caso de una celda compuesta de dos electrodos inmersos en una solución, al aplicar un potencial externo entre dichos electrodos, se producirá la circulación de una corriente eléctrica derivada de los procesos electroquímicos que ocurren en la interfase electrodo-solución. El origen de esta corriente puede ser la transferencia de carga debida a reacciones químicas (procesos faradaicos) o a la reorganización de la carga en la interfase (procesos no faradaicos).

20

25

Método de detección

El método de detección de la enfermedad celíaca consiste en lo que se denomina un inmunoensayo que, en el marco de la presente invención, incluye conjuntos de técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que tienen en común la utilización de complejos inmunes, es decir el resultado de hacer interaccionar anticuerpos con antígenos, con la finalidad de detectar y/o cuantificar analitos en muestras. La selectividad de los anticuerpos para unirse a sus ligandos permite a estas biomoléculas ser empleadas en métodos analíticos altamente específicos cuando se trata de matrices complejas como sangre, plasma u orina. Combinando la selectividad de las interacciones anticuerpo-antígeno con una gran diversidad de

30

35

anticuerpos preformados en los procesos de inmunización de animales huéspedes y la disponibilidad de numerosos marcadores fácilmente detectables (radioisótopos, absorbancia, fluorescencia o quimio-luminiscencia inducida enzimática o electroquímicamente) los inmunoensayos pueden ser diseñados para una amplia
5 variedad de analitos con límites de detección extraordinariamente bajos. Ejemplos de estos límites son niveles de concentración de hormonas, enzimas, virus, antígenos tumorales y bacteriales cercanos a 10^{-12} - 10^{-9} mol/L.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores incluyen elementos radiactivos (por ejemplo, azufre, yodo, etc.); enzimas (por ejemplo, peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa HRP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, etc.); compuestos o colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, etc.), fosforescentes o quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc.). La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales. Así, el complejo formado puede ser detectado o visualizado por cualquier técnica apropiada, dependiendo del marcador elegido, bien conocida por los técnicos en la materia, utilizando los dispositivos apropiados, por ejemplo, mediante técnicas basadas en métodos radiactivos, electroquímicos, colorimétricos, fluorimétricos, (quimio)luminiscentes, etc., todas ellas conocidas por los técnicos en la materia.
10
15
20

A modo de ejemplo, cuando el marcador es una enzima, la detección del complejo (antígeno-anticuerpo)/marcador puede llevarse a cabo poniendo en contacto dicho complejo con un sustrato apropiado y, opcionalmente, con los activadores y/o agentes de amplificación enzimáticos apropiados. Ejemplos ilustrativos de dichos sustratos incluyen para:
25

- la fosfatasa alcalina: sustratos basados en *p*-nitrofenil fosfato (p-NPP) o 2-(5-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)quinazolinona (CPPCQ);
- peroxidasas: sustratos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ofenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9etilcarbazol (AEC) y tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas.
30
35

- glicosidasas: sustratos basados en o-nitrofenil- β -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactósido y 4-metilumbelifenil- β -D-galactósido (MUG) para β -D-galactosidasa

5 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formatos de inmunoensayos adecuados para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención incluyen ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich-ELISA"), DELFIA (fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos), FPIA (inmunoensayo por polarización de fluorescencia), CMIA (inmunoensayo magnético quimioluminiscente), IRMA (radioinmunoensayo heterogéneo y no competitivo), MEIA (inmunoensayo por micropartícula),
10 luminoensayos, técnicas inmunocitoquímicas e inmuno-histoquímicas, ensayos basados en la precipitación coloidal (dipsticks). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de plataformas para la realización de estos inmunoensayos incluyen placas de microtitulación, biochips, biosensores (por ejemplo, inmunosensores) o microarrays, lab-on-a-chip, dipsticks, inmunoensayos por cromatografía de flujo lateral basado en el
15 empleo de tiras inmunocromatográficas, y, en todos los casos, a los que se les ha acoplado o integrado un imán.

Así pues, también forma parte del objeto de la invención un método para detectar la enfermedad celíaca, que comprende las siguientes etapas:

- 20 1) incubar una suspensión del péptido magnético de la invención con una muestra de suero o sangre de un individuo,
- 2) añadir anti-suero humana-HRP, seleccionado de entre anti-IgA humana-HRP y anti-IgG humana-HRP, a la suspensión incubada en el punto 1) e incubar la suspensión obtenida, y
- 25 3) medir la señal electroquímica u óptica obtenida a partir de la suspensión obtenida en el punto 2).

En la etapa 2) se emplean anticuerpos anti-suero humana-HRP, que preferiblemente son anti-IgA humana-HRP, donde HRP corresponde a la enzima peroxidasa del rábano, porque presentan ventajas con respecto a otros anticuerpos.
30 La peroxidasa HRP es una proteína de 40 kDa que cataliza la oxidación de sustratos por medio del peróxido de hidrógeno, resultando un producto coloreado o fluorescente o la emisión de luz como producto secundario. Dicha enzima funciona óptimamente a un pH aproximadamente neutro, y puede ser inhibido por cianuros, sulfuros y azidas. Los conjugados anticuerpos-HRP son superiores a los conjugados anticuerpos-
35 fosfatasa alcalina con respecto a las actividades específicas de la enzima y del

anticuerpo. Además, dicha peroxidasa presenta una elevada velocidad enzimática, buena estabilidad, bajo coste y amplia disponibilidad, por lo que es una de las enzimas a escoger para la mayoría de aplicaciones.

5 El método de la invención se trata de un inmunoensayo en el que el antígeno inmovilizado en la partícula magnética (péptido magnético de la invención) capta al anticuerpo a investigar (presente en el suero o sangre de un individuo) y el inmunocomplejo así formado luego se une a un anticuerpo marcado con la enzima (anti-IgA humana-HRP) que genera una señal electroquímica u óptica directamente
10 proporcional a la concentración de anticuerpo en la muestra, una vez que todo el inmunocomplejo se capta en una plataforma para su detección a partir de la aplicación de campo magnético permanente. La incubación se puede llevar a cabo en tubos Eppendorff empleando entre 50 y 100 μ L, preferiblemente entre 60 y 80 μ L de una solución de péptido magnético de la invención a una concentración de 0,2 mg/mL. La incubación de la suspensión del péptido magnético con una muestra de suero o
15 sangre de un individuo que puede padecer la EC se lleva a cabo habitualmente a una temperatura comprendida entre 20° C y 27° C, preferiblemente alrededor de 25° C, durante un período de tiempo comprendido entre 20 y 45 minutos, preferiblemente entre 25 y 35 minutos, y aún más preferiblemente alrededor de 30 minutos.

20 La incubación de la suspensión obtenida después de añadir anti-IgA humana-HRP se lleva a cabo habitualmente a una temperatura comprendida entre 20° C y 27° C, preferiblemente alrededor de 25° C, durante un período de tiempo comprendido entre 20 y 45 minutos, preferiblemente entre 25 y 35 minutos, y aún más preferiblemente alrededor de 30 minutos.

25 Después de cada etapa se aplica un campo magnético permanente para capturar las partículas magnéticas y proceder a lavados con tampón PBS, siguiendo procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

30 La medida de la señal electroquímica u óptica se puede realizar mediante la medición de una señal generada por la enzima HRP por reacción con peróxido de hidrógeno como sustrato y un mediador seleccionado de un grupo formado por fenol, *o*-fenilendiamina (OPD), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), hidroquinona, *p*-clorofenol, pirocatecol y *p*-aminofenol. Preferiblemente se emplea hidroquinona como mediador para la detección electroquímica y TMB para la óptica.

35 Forma parte del objeto de la invención el uso del péptido de la invención para detectar la enfermedad celíaca.

También forma parte del objeto de la invención el uso del péptido magnético de la invención para detectar la enfermedad celíaca.

También forma parte del objeto de la invención el uso del inmunosensor para detectar la enfermedad celíaca.

5 Forma parte también de la invención un kit para detectar la enfermedad celíaca que comprende el péptido magnético de la invención.

10 El kit de la invención incluye, además del péptido magnético, un inmunoensayo adecuado o plataforma para la puesta en práctica del método para detectar la enfermedad celíaca. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formatos de inmunoensayos adecuados para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención incluyen ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich-ELISA"), DELFIA (fluoroimmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos), FPIA (inmunoensayo por polarización de fluorescencia), CMIA (inmunoensayo magnético quimioluminiscente), IRMA (radioinmunoensayo heterogéneo y no competitivo), MEIA (inmunoensayo por micropartícula), luminoimmunoensayos, técnicas inmunocitoquímicas e inmuno-histoquímicas, ensayos basados en la precipitación coloidal (dipsticks). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de plataformas para la realización de estos inmunoensayos incluyen placas de microtitulación, biochips, biosensores (por ejemplo, inmunosensores) o microarrays, lab-on-a-chip, dipsticks, inmunoensayos por cromatografía de flujo lateral basado en el empleo de tiras inmunocromatográficas, y, en todos los casos, a los que se les ha acoplado o integrado un imán.

Ensayos de detección

25 Se evaluaron sueros de pacientes clínicamente clasificados como celíacos y no-celíacos, en ambos casos confirmados por biopsia, mediante el inmunosensor electroquímico de la invención destinado a la detección individual de los anticuerpos anti-APDG-IgA. Además, estos sueros también fueron analizados con un ELISA óptico. Además se ensayó un inmunosensor electroquímico obtenido en el Ejemplo de referencia 1, en el que el péptido de la invención se unió de forma covalente a partículas poliméricas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo.

Los resultados de cada inmunosensor fueron analizados a partir de los datos de sensibilidad y de especificidad.

35

La sensibilidad corresponde a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad, y viene definida por la siguiente ecuación:

$$SE = \frac{\text{enfermos positivos}}{\text{total enfermos}} = \frac{vp}{vp + fn}$$

en donde *vp* corresponde a una muestra verdaderamente positiva y *fn* corresponde a una muestra falsa negativa.

Por su parte, la especificidad se calcula como la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad y viene definida por la siguiente ecuación:

$$ES = \frac{\text{sanos negativos}}{\text{total sanos}} = \frac{vn}{vn + fp}$$

en donde *vn* corresponde a una muestra verdaderamente negativa, y *fp* corresponde a una muestra falsa positiva.

Una prueba diagnóstica ideal debería tener una SE y una ES tan próximas al 100% como fuera posible. En la práctica se debe dudar de pruebas cuyas SE y ES sean inferiores al 80%.

Se ha observado que el inmunosensor con el péptido magnético de la invención presenta para las diversas muestras ensayadas las mayores señales electroquímicas y permitió una mejor diferenciación entre muestras positivas y negativas con respecto al inmunosensor obtenido en el Ejemplo de referencia 1, en el que el péptido de la invención se unió de forma covalente a partículas poliméricas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo. En un ensayo con 11 muestras, 7 positivas y 4 negativas, el inmunosensor con el péptido magnético de la invención presentó una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100%, y una eficiencia del 100%, mientras que el inmunosensor con el péptido unido covalentemente presentó una sensibilidad del 86%, una especificidad del 75%, y una eficiencia del 82%, en donde este último parámetro es calculado como porcentaje de los resultados correctamente positivos y correctamente negativos con respecto al valor de referencia esperado.

También se ha observado que con el péptido magnético de la invención se han podido discriminar el 100% de los 23 pacientes que tenían la EC confirmada por biopsia. Se puede observar también que, sorprendentemente, el péptido magnético de la invención, que comprende el péptido de la invención y un complejo magnético particulado, permite proporcionar un método de detección de la EC con una

selectividad y especificidad significativamente superiores a las de los otros métodos de detección descritos en el estado de la técnica. En comparación con el método descrito en Ankelo *et al.*, ya citado, en el que se emplea el péptido definido por la secuencia SEQ_ID_NO: 40 modificado con biotina en un ensayo inmunofluorométrico en fase
5 sólida lantánido, presenta una sensibilidad y una especificidad superiores, 100% vs 92%, y 100% vs 96%, respectivamente. En comparación con el método descrito en Schwertz *et al.*, en el que se emplean octadecapéptidos deaminados definidos por las SEQ_ID_NO: 40 a 51, el péptido de la invención presenta una sensibilidad y especificidad superiores, 100% vs 85% y 100% vs 95%, respectivamente.

10 Dicho método constituye un ensayo de detección rápido, económico, mínima manipulación, y puede ser empleado para análisis ambulatorios, por lo que el objeto de la invención representa un desarrollo significativo para la detección de la enfermedad celíaca. Además, cabe destacar que las metodologías electroquímicas presentan la potencialidad, frente a los ensayos ELISA ópticos, de poder desarrollar
15 dispositivos de pequeñas dimensiones que permiten disminuir el volumen de muestra y reactivos y ser acoplados a instrumentación portátil fácilmente transportable a los diferentes centros de salud alejados de las grandes urbanizaciones.

El experto en la materia no tiene dificultad en aplicar el péptido magnético de la invención a otras plataformas con sistemas de detección distintos al inmunosensor electroquímico o al inmunoensayo ELISA óptico que se han descrito,
20 tales como ensayos de flujo lateral o sistemas de microfluídica.

A continuación se incluyen algunos ejemplos para ilustrar la presente invención, si bien no deben ser considerados como limitantes de la misma.

25 Ejemplos

La inmovilización de los péptidos sobre las partículas magnéticas se llevó a cabo usando un Termomixer Eppendorf. Se utilizaron placas ELISA de poliestireno marca Nunc (Roskilde, Dinamarca). La separación magnética de las
30 partículas se realizó mediante un separador magnético Dynal MPC-S (Dynal, Noruega). En las etapas de incubaciones y lavados se utilizaron un Miniagitador MS1 (IKA, R.F.A.) y un Termomixer Eppendorf. Las medidas ópticas y electroquímicas se realizaron con un lector de placas TECAN Sunrise y con un controlador amperométrico LC-4C (BAS Bioanalytical System Inc., E.E.U.U.).

35

Se utilizó una celda electroquímica que consistió en un sistema de tres electrodos independientes: un electrodo m-GEC (composite grafito–epoxi con conector magnético, por sus siglas en inglés) como trabajo; un electrodo de platino como auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl en solución 3 mol L⁻¹ de NaCl como referencia (Orion 92-02-00). Los electrodos m-GEC se encuentran descritos en Zacco *et al.*, *Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues*, Anal. Chem., 2006, 78, 1780-1788. Se prepararon diez electrodos m-GEC con sus conectores magnéticos y el CV% obtenido del promedio de las inducciones magnéticas medidas en el centro de la superficie del electrodo fue 6,4%.

Ejemplo comparativo: Inmovilización del péptido en partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo

El péptido deaminado de gliadina (PDG) de secuencia HHHHHHLPFPEQPEQPFPQPEQPQ (99,2% pureza) (GenScript, Cat. nº 246440) se inmovilizó sobre las partículas magnéticas (PM) de 1 µm de diámetro modificadas con grupos tosilo Dynabeads MyOne™ Tosylactivated (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Para ello, 10 mg de PM, equivalente a un volumen de 100 µL (100 mg mL⁻¹) se lavaron dos veces con 200 µL de solución tampón de inmovilización (fosfato de sodio 0,05 M, pH 8). Posteriormente, las PM se resuspendieron en 83 µL de sulfato de amonio 3 mol L⁻¹, 50 µL de la solución concentrada de PDG (4,3 mg mL⁻¹), y se añadió solución tampón de inmovilización hasta llegar a un volumen final de 250 µL. Las PM se incubaron durante 24 horas a 37° C y 800 rpm. Se eliminó el sobrenadante con la ayuda de un imán y las PM modificadas se resuspendieron en 250 µL de solución tampón bloqueante (QUÉ ES?) y se incubaron durante toda la noche, en las mismas condiciones que la inmovilización. Las PM se sometieron a tres etapas de lavado con el solución tampón de lavado y finalmente se resuspendieron en el solución tampón de conservación para lograr las soluciones concentradas de 4 mg mL⁻¹ de PM-PDG las cuales se conservaron a 4°C.

Ejemplo 1: Inmovilización del péptido en partículas magnéticas Dynabeads® TALON®

El péptido deaminado de gliadina (PDG) de secuencia HHHHHHLPFPEQPEQPFPQPEQPQ (99,2% pureza) (GenScript, Cat. nº 246440) se inmovilizó sobre las partículas magnéticas (PM) de 1 µm de diámetro Dynabeads®

TALON[®] (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Es decir, en un tubo Eppendorf se lavaron 50 μL o 2 mg de PM (40 mg mL^{-1}) con 650 μL de solución tampón de inmovilización/lavado (fosfato de sodio 0,05 M, pH 8, NaCl 0,3 M, y 0,01 % de Tween[®] 20, monolaurato de sorbitán con 20 moles de óxido de etileno). Luego se descartó el sobrenadante mediante la aplicación de un campo magnético y las PM se incubaron con 10 μL , equivalentes a 4,3 μg de PDG (a partir de la solución concentrada en agua desionizada de $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$) en un volumen final de 700 μL con solución tampón de inmovilización/lavado, durante 10 minutos a 750 rpm y 25° C. Después de la incubación, el líquido sobrenadante de cada tubo se separó con la ayuda de un magneto y las PM modificadas se lavaron cuatro veces con 700 μL del solución tampón de inmovilización/lavado y finalmente se resuspendieron en tampón PBS para lograr una solución de trabajo de 4 mg/mL, a partir de la cual se preparó una solución diluida con una concentración de 0,2 mg/mL.

Ejemplo 2: Ensayos de detección de la enfermedad celíaca

Se efectuaron ensayos de detección empleando una celda electroquímica y también empleando el inmunoensayo óptico ELISA.

En el primer caso, el ensayo de detección comprendió las siguientes etapas:

- 1) Primer etapa de incubación: 70 μL de la solución de 0,2 mg/mL de péptido magnético obtenido en el Ejemplo 1, se incubaron con 70 μL de los controles positivo y negativo, y de suero problema en sendos tubos Eppendorff de 2 mL a 800 rpm y 25° C durante 30 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante con la ayuda de un separador magnético y se realizaron tres etapas de lavado con 100 μL de solución tampón PBS a 800 rpm y 25° C durante 3 minutos, aplicando el separador magnético después de cada etapa.
- 2) Segunda etapa de incubación: se adicionaron 140 μL de anti-IgA humana-HRP diluido 1:20000 y se incubaron a 800 rpm y 25° C durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicaron las etapas de lavado de igual manera que en el paso (i).
- 3) Medida electroquímica: en la última etapa de lavado se capturaron las partículas magnéticas modificadas mediante los electrodos m-GEC y este electrodo de trabajo junto con los electrodos de referencia y auxiliar se sumergieron en 20 mL de solución tampón PBS contenido en una celda electroquímica. La medida electroquímica se determinó por polarización del

electrodo de trabajo a $E = -0,050$ V (contra Ag/AgCl en solución 3 mol/L de NaCl como electrodo de referencia). La señal amperométrica se basó en la actividad enzimática de HRP después de la adición de hidroquinona ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) como mediador y H_2O_2 ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) como sustrato.

5 Los anticuerpos anti-IgA humana-HRP se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

En el segundo caso, se realizó un ensayo ELISA con detección óptica en una placa de 96 pocillos, que comprendió las siguientes etapas:

- 10 1) Primera etapa de incubación: 70 μ L de la solución de 0,2 mg/mL de péptido magnético obtenido en el Ejemplo 1, se incubaron con 70 μ L de los controles positivo y negativo, y de suero problema en placas de microtitulación, en condiciones de agitación durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados con 100 μ L de PBST, aplicando un campo magnético entre los lavados con la finalidad de separar las PM modificadas del sobrenadante.
- 15 2) Segunda etapa de incubación: se adicionaron 100 μ l de anti-IgA humana-HRP diluido 1:20000 y el inmunocomplejo resultante se incubó durante 30 min a temperatura ambiente bajo condiciones de agitación. Posteriormente, se aplicó nuevamente la etapa de lavado explicada en (1).
- 20 3) Se adicionaron a cada pocillo 100 μ L de solución TMB: H_2O_2 (1:1) y la placa se incubó durante 30 minutos en oscuridad, luego se agregaron 100 μ L de solución de parada (H_2SO_4 2 M);
- 25 4) Finalmente se realizó la lectura de absorbancia de cada pocillo con un lector de placa a $\lambda = 450$ nm.

Con ambos métodos se analizaron 23 sueros, que habían sido confirmados histológicamente con biopsia duodenal, de los cuáles, a su vez, 13 y 10 sueros fueron clasificados como celíacos y no celíacos, respectivamente.

30 En la tabla I se muestran los resultados obtenidos (sensibilidad, SE, y especificidad, ES) con el péptido magnético de la invención tanto con el inmunosensor electroquímico, como con el inmunoensayo óptico ELISA y los resultados obtenidos en los hospitales de origen para las mismas muestras (23) mediante el empleo de métodos comerciales:

35

TABLA I

Método	Anticuerpo	SE (%)	ES (%)
Electrodo m-GEC Inmunosensor electroquímico (Invención)	APDG-IgA	100	100
Microplaca ELISA Inmunoensayo óptico (Invención)	APDG-IgA	100	100
Método comercial 1	AGA-IgA	96,3	50,0
Método comercial 2	AGA-IgA	96,2	91,7
Método comercial 3	ATG ₂ -IgA	95,0	99,4
Método comercial 4	ATG ₂ -IgA	93,6	94,3

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos resultados obtenidos (sensibilidad, SE, y especificidad, ES) con el péptido magnético de la invención tanto con el inmunosensor electroquímico, como con el inmunoensayo óptico ELISA y resultados descritos en el estado de la técnica para la detección de anticuerpos anti-PDG como diagnóstico de la enfermedad celíaca:

TABLA II

Soporte	Técnica analítica	Isotipo	SE (%)	ES (%)	Nº de muestras*	Ref.
Electrodo m-GEC	Inmunosensor electroquímico	IgA	100	100	23	Invención
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	100	100	23	Invención
Fase sólida lantánido	Ensayo inmunofluorométrico	IgA	92	90	168	1

Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	97	92	139	2
Microplaca ELISA	Inmunoensayo óptico	IgA	85	96	128	3

* Muestras positivas comprobadas por biopsia duodenal

1 Ankelo *et al.*, 2007

2 Sakly *et al.*, 2012

3 Schwertz *et al.*, 2004

Se puede observar que el método de la invención presenta una sensibilidad y especificidad superiores a otros métodos descritos en el estado de la técnica basados en la detección de anticuerpos frente a péptidos deaminados de gliadina.

Ejemplo 3: Ensayo de detección de la enfermedad celíaca con dos tipos de péptidos magnéticos

Se ensayaron los péptidos magnéticos obtenidos en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo comparativo de acuerdo con un procedimiento sustancialmente análogo al del Ejemplo 2. Se ensayaron once muestras: siete sueros positivos y cuatro sueros negativos.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que el inmunosensor con el péptido magnético de la invención presentó para las diversas muestras las mayores señales electroquímicas y permitió una mejor diferenciación entre muestras positivas y negativas con respecto al inmunosensor preparado a partir del péptido obtenido en el Ejemplo comparativo, en el que el péptido estaba unido covalentemente con las partículas magnéticas modificadas con el grupo tosilo.

En la Tabla III se presentan los resultados obtenidos:

TABLA III

Parámetro	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo
Sensibilidad (%)	100	86
Especificidad (%)	100	75
Eficiencia (%)	100	82

REIVINDICACIONES

1.- Péptido caracterizado porque responde a la fórmula general (I):

5



en donde:

X es Q o E indistintamente, y al menos un X es E, y

en donde:

n está comprendido entre 2 y 20, y m es 0, o

10

m está comprendido entre 2 y 20, y n es 0.

2.- Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque m es 0 y n está comprendida entre 4 y 15.

15

3.- Péptido según la reivindicación 2, caracterizado porque m es 0 y n está comprendida entre 6 y 8.

4.- Péptido según la reivindicación 3, caracterizado porque responde a la estructura $\text{H}_2\text{N}-(\text{H})_6\text{-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH}$ (SEQ_ID_NO: 39).

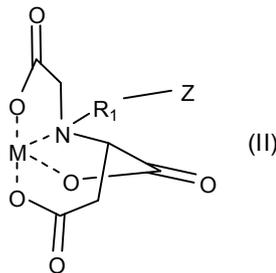
20

5.- Péptido magnético, caracterizado porque comprende:

a) el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

b) un complejo magnético particulado de fórmula general (II):

25



30

en donde:

Z es una partícula polimérica magnética unida covalentemente al ligando aspartato carboximetilado a través de R₁,

R₁ es un brazo de unión que conecta el átomo de nitrógeno del ligando aspartato carboximetilado con la partícula polimérica magnética Z, y

35

M es un ion de un metal de transición con un número de coordinación 6.

6.- Péptido magnético según la reivindicación 5, caracterizado porque la partícula polimérica magnética está constituida por un polímero estirénico reticulado.

5 7.- Péptido magnético según las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado porque el brazo de unión R_1 consta de una cadena de entre 3 y 20 átomos y se selecciona de entre -alquileno-NH-, -alquileno-CO-NH-, -alquileno-NH-CO-, -alquileno-O-, -alquileno-CO-O-,
 10 -alquileno-O-CO-, -alquileno-S-, -alquileno-CO-S-, -alquileno-S-CO-, -alquileno-NH-alquileno- R_2 , -alquileno-NH-CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-NH-alquileno- R_2 , -
 alquileno-O-alquileno- R_2 , -alquileno-O-CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-O-alquileno- R_2 ,
 -alquileno-S-alquileno- R_2 , -alquileno-S-CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-S-alquileno- R_2 ,
 -hidroxialquileno-NH-, -hidroxialquileno-CO-NH-, -hidroxialquileno-NH-CO-, -
 hidroxialquileno-O-, -hidroxialquileno-CO-O-, -hidroxialquileno-O-CO-, -
 hidroxialquileno-S-, -hidroxialquileno-CO-S-, -hidroxialquileno-S-CO-, -hidroxialquileno-
 15 NH-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-NH-CO-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-CO-NH-
 alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-O-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-O-CO-alquileno- R_2 , -
 hidroxialquileno-CO-O-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-S-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-
 S-CO-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-CO-S-alquileno- R_2 , -alquileno-NH-
 hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-NH-CO-hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-CO-NH-
 20 hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-O-hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-O-CO-
 hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-CO-O-hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-S-hidroxialquileno-
 R_2 , -alquileno-S-CO-hidroxialquileno- R_2 , y -alquileno-CO-S-hidroxialquileno- R_2 , en
 donde R_2 es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

25 8.- Péptido magnético la reivindicación 7, caracterizado porque el brazo de unión R_1 se
 selecciona de entre -alquileno-NH-, -alquileno-CO-NH-, -alquileno-NH-CO-, -alquileno-
 O-, -alquileno-CO-O-, -alquileno-O-CO-, -alquileno-NH-alquileno- R_2 , -alquileno-NH-
 CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-NH-alquileno- R_2 , -alquileno-O-alquileno- R_2 , -alquileno-
 O-CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-O-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-NH-, -
 30 hidroxialquileno-CO-NH-, -hidroxialquileno-NH-CO-, -hidroxialquileno-O-, -
 hidroxialquileno-CO-O-, -hidroxialquileno-O-CO-, -hidroxialquileno-NH-alquileno- R_2 , -
 hidroxialquileno-NH-CO-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-CO-NH-alquileno- R_2 , -
 hidroxialquileno-O-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-O-CO-alquileno- R_2 , -hidroxialquileno-
 CO-O-alquileno- R_2 , -alquileno-NH-hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-NH-CO-
 35 hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-CO-NH-hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-O-

hidroxialquileno- R_2 , -alquileno-O-CO-hidroxialquileno- R_2 , y -alquileno-CO-O-hidroxialquileno- R_2 , en donde R_2 es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

5 9.- Péptido magnético según la reivindicación 8, caracterizado porque el brazo de unión R_1 se selecciona de entre -alquileno-NH-alquileno- R_2 , -alquileno-NH-CO-alquileno- R_2 , -alquileno-CO-NH-alquileno- R_2 , -alquileno-O-alquileno- R_2 , -alquileno-O-CO-alquileno- R_2 , y -alquileno-CO-O-alquileno- R_2 en donde R_2 es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

10 10.- Péptido magnético según la reivindicación 9, caracterizado porque el brazo de unión R_1 es -alquileno-NH-alquileno- R_2 en donde R_2 es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

15 11.- Péptido magnético según la reivindicación 10, caracterizado porque el brazo de unión R_1 es $-(CH_2)_x-NH-(CH_2)_y-NH$, en donde x e y están comprendidos entre 1 y 6, y preferiblemente entre 3 y 5.

20 12.- Péptido magnético según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, caracterizado porque el metal de transición M se selecciona de entre el grupo formado por Ni, Fe, Ga, Mn, Co, Cu y Zn.

13.- Péptido magnético según la reivindicación 12, caracterizado porque el metal de transición M se selecciona de entre el grupo formado por Ni, Fe, Mn y Co.

25 14.- Péptido magnético según la reivindicación 13, caracterizado porque el metal de transición M es Co.

30 15.- Péptido magnético según la reivindicación 14, caracterizado porque el metal de transición tiene un estado de oxidación de +2.

35 16.- Péptido magnético según la reivindicación 5, caracterizado porque el complejo magnético particulado es *Dynabeads*[®] *TALON*[®].

17.- Inmunosensor caracterizado porque comprende el péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16 y un transductor que tiene acoplado o integrado un imán.

5 18.- Método para detectar la enfermedad celíaca, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 1) incubar una suspensión del péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15 con una muestra de suero o sangre de un individuo,
- 10 2) añadir anti-suero humana-HRP, seleccionado de entre anti-IgA humana-HRP y anti-IgG humana-HRP, a la suspensión incubada en el punto 1) e incubar la suspensión obtenida, y
- 3) medir la señal electroquímica u óptica obtenida a partir de la suspensión obtenida en el punto 2).

15 19.- Kit para detectar la enfermedad celíaca, caracterizado porque comprende el péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16.

20 20.- Uso del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para detectar la enfermedad celíaca.

21.- Uso del péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16 para detectar la enfermedad celíaca.

25 22.- Uso del inmunosensor de la reivindicación 17 para detectar la enfermedad celíaca.

30

35

Listado de Secuencias

- <110> Universitat Autònoma de Barcelona
- <120> Péptido, péptido magnético y método para detectar la enfermedad celíaca
- <130> P201402
- <160> 52
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Synthetic peptide

- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> (1)..(20)
- <223> Synthetic peptide

- X is Q or E, at least one is E

- <400> 1

- His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro
1 5 10 15

- Xaa Xaa Pro Xaa
 20

- <210> 2
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Synthetic peptide

- <220>
- <221> PEPTIDE

<222> (1)..(21)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 2

His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa Xaa Pro Xaa
20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(22)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 3

His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro
1 5 10 15

Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
20

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(23)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 4

His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe
1 5 10 15

Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
20

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(24)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 5

His His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro
1 5 10 15

Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
20

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(25)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 6

His His His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25

<210> 7
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(26)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 7

His His His His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa
1 5 10 15

Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(27)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 8

His His His His His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro
1 5 10 15

Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25

<210> 9
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(28)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 9

His His His His His His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25

<210> 10
<211> 29
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(29)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 10

His Leu Pro Phe Pro Xaa
1 5 10 15

Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(30)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 11

His Leu Pro Phe Pro
1 5 10 15

Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

<210> 12

<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(31)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 12

His Leu Pro Phe
1 5 10 15

Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(32)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 13

His Leu Pro
1 5 10 15

Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 20 25 30

<210> 14
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(33)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 14

His Leu
1 5 10 15

Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa Pro
 20 25 30

Xaa

<210> 15
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(34)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 15

His His

ES 2 465 715 B1

1 5 10 15

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
 20 25 30

Pro Xaa

<210> 16
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(35)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 16

His
1 5 10 15

His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa
 20 25 30

Xaa Pro Xaa
 35

<210> 17
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(36)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 17

His
1 5 10 15

His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro
 20 25 30

Xaa Xaa Pro Xaa
 35

<210> 18
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(37)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 18

His
1 5 10 15

His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa
 20 25 30

Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 35

<210> 19
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(38)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 19

His
1 5 10 15

His His His His Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro
 20 25 30

Xaa Pro Xaa Xaa Pro Xaa
 35

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(20)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 20

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa

1 5 10 15

Pro Xaa His His
20

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(21)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 21

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His
20

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(22)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 22

ES 2 465 715 B1

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His
20

<210> 23
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(23)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 23

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His His
20

<210> 24
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(24)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 24

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His His His
 20

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(25)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 25

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His His His His
 20 25

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(26)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 26

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His His His His His
 20 25

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(27)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 27

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His His His His His His His His
 20 25

<210> 28

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(28)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 28

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25

<210> 29
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(29)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 29

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(30)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 30

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

<210> 31
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(31)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 31

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(32)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 32

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

<210> 33

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(33)

<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 33

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

His

<210> 34
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(34)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 34

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

His His

<210> 35
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(35)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 35

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
20 25 30

His His His
35

<210> 36
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(36)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 36

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
20 25 30

His His His His
35

<210> 37
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(37)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 37

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

His His His His His
 35

<210> 38
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(38)
<223> Synthetic peptide

X is Q or E, at least one is E

<400> 38

Leu Pro Phe Pro Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Pro Phe Pro Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Pro Xaa His
 20 25 30

His His His His His His
 35

<210> 39
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 39

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

Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Gln
 20

<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 40

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

Pro Gln

<210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 41

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

Pro Gln

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 42

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

Pro Gln

<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 43

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

Pro Gln

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 44

ES 2 465 715 B1

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

Pro Glu

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 45

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

Pro Gln

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 46

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

Pro Gln

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 465 715 B1

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 47

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

Pro Gln

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 48

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

Pro Gln

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 49

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

Pro Gln

<210> 50

<211> 18

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 50

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

Pro Gln

<210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 51

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

Pro Gln

<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 52

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

Pro Gln Lys



- ②① N.º solicitud: 201430198
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.02.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SCHWERTZ E. et al. Serologic Assay Based on Gliadin-Related Nonapeptides as a Highly Sensitive and Specific Diagnostic Aid in Celiac Disease. Clinical Chemistry. 2004, Vol. 50(12), páginas: 2370-2375, todo el documento.	1-4,20
Y		5-19,21,22
Y	WO 2005089933 A1 (DYNAL BIOTECH ASA [NO/NO]) 29.09.2005, página 1, líneas 3-22; página 5, líneas 7-28; página 18, línea 28 – página 20, línea 7.	5-16,19,21
Y	LAUBE T. et al. Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten free food-stuff: Towards food safety for celiac patients. Biosensors and Bioelectronics. 2011, Vol. 27, páginas: 46-52, todo el documento.	17,18,22
A	US 20130109034 A1 (KUMAR V. et al.) 02.05.2103, página 2, párrafos [0018]-[0020]; página 3, párrafos [0026]-[0028].	1-22
A	US 20090311727 A1 (WATKINS MI et al.) 17.12.2009, página 2, párrafos [0008],[0009]; página 5, párrafos [0046]-[0051]; reivindicaciones 1-20.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.05.2014

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/415 (2006.01)

C07K17/14 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

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

C07K, G01N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.05.2014

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SCHWERTZ E. et al. Clinical Chemistry. 2004, Vol. 50(12), páginas: 2370-2375.	2004
D02	WO 2005089933 A1	29.09.2005
D03	LAUBE T. et al. Biosensors and Bioelectronics. 2011, Vol. 27, páginas: 46-52.	
D04	US 20130109034 A1	02.05.2103
D05	US 20090311727 A1	17.12.2009

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

La presente invención divulga un péptido (SEQ ID NO: 1-39) útil para preparar un péptido magnético y el uso de ambos en un método para detectar la enfermedad celiaca. Se refiere también a un inmunosensor y a un kit que contienen el péptido magnético (reivindicaciones 1-22).

El documento D01 divulga unos péptidos relacionados con la proteína gliadina que son detectados por la enzima IgA en muestras de suero de pacientes celíacos y que presentan anticuerpos antiendomiso (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un procedimiento de unión de una proteína a una partícula polimérica magnética, estando dicha proteína unida a una cola de histidinas o lisinas (ver página 1, líneas 3-22; página 5, líneas 7-28; página 18, línea 28 - página 20, línea 7).

El documento D03 divulga un inmunosensor magnético electroquímico y su uso para detección de gliadina o fragmentos de esta proteína en productos alimenticios para consumo de pacientes celíacos (todo el documento).

El documento D04 divulga una proteína recombinante que contiene secuencias de gliadina desaminadas y su uso en composiciones y métodos para diagnóstico de la enfermedad celiaca, basándose en la detección de anticuerpos que reconocen dicha proteína (ver página 2, párrafos [0018] - [0020]; página 3, párrafos [0026] - [0028]).

El documento D05 divulga un método para diagnosticar una enfermedad celiaca en un sujeto, basado en la detección de anticuerpos en una muestra de un fluido del paciente empleando un antígeno formado por una gliadina desaminada inmovilizada sobre un soporte sólido y fusionada a otra molécula (ver página 2, párrafos [0008] y [0009]; página 5, párrafos [0046] - [0051]; reivindicaciones 1-20).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es un péptido (SEQ ID NO: 1-39) útil para preparar un péptido magnético y un inmunosensor y su uso en un método para detectar la enfermedad celiaca.

1.1. REIVINDICACIONES 1-22

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa unos péptidos relacionados con la proteína gliadina cuyas secuencias están contenidas en las secuencias del péptido reivindicado.

La diferencia entre las secuencias anticipadas en el documento D01 y las reivindicadas en la presente solicitud radica las colas de histidina y en la unión del péptido a partículas poliméricas magnéticas, lo que no ha sido encontrado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en D01 las reivindicaciones 1-22 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**2.1. REIVINDICACIONES 1-4 y 20**

La diferencia entre las secuencias anticipadas en el documento D01 y las secuencias incluidas en las reivindicaciones 1-4 y 20 radica en las colas de histidina. El uso de colas de histidina es una técnica muy empleada en biotecnología con objeto de mejorar el aislamiento y actividad de ciertas moléculas. De este modo, se considera que sería obvio para un experto en la materia la incorporación de colas de histidina a los péptidos divulgados en D01 para potenciar su actividad.

En consecuencia, según el documento D01 las reivindicaciones 1-4 y 20 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIONES 5-16, 19 y 21

La diferencia entre las secuencias anticipadas en el documento D01 y las secuencias incluidas en las reivindicaciones 5-16, 19 y 21 radica, además de las colas de histidina, en la unión a una partícula polimérica magnética. El documento D04 anticipa un procedimiento de unión de una proteína a una partícula polimérica magnética, estando dicha proteína unida a una cola de histidinas, incluyendo el complejo magnético *Dynabeads® TALON®*

En consecuencia, según D01 en combinación con el documento D04, las reivindicaciones 5-16, 19 y 21 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.3. REIVINDICACIONES 17, 18 y 22

La diferencia entre el documento D01 y las reivindicaciones 17, 18 y 22 radica en la incorporación del péptido a un inmunosensor. El documento D05 anticipa un inmunosensor magnético electroquímico y su uso para detección de gliadina o fragmentos de esta proteína.

En consecuencia, según D01 en combinación con el documento D05, las reivindicaciones 17, 18 y 22 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).