

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional

WO 2015/121526 A1

(43) Fecha de publicación internacional
20 de agosto de 2015 (20.08.2015) **W I P O I P C T**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
C07K 14/415 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES20 15/070097
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
16 de febrero de 2015 (16.02.2015)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201430198
14 de febrero de 2014 (14.02.2014) ES
- (71) **Solicitante:** UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA [ES/ES]; Edifici A, Rectorat, Campus universitari UAB, s/n, E-08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Barcelona (ES).
- (72) **Inventores:** PIVmORI GURGO, Maria Isabel; Edifici Eureka, Campus UAB, s/n, E-08193 Cerdanyola del Vallés Barcelona (ES). KERGARAVAT, Silvina Vanesa; Edifici Eureka, Campus de la UAB, s/n, E-08 193 Cerdanyola del Vallés Barcelona (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))



WO 2015/121526 A1

(54) **Title:** PEPTIDE, MAGNETIC PEPTIDE AND METHOD FOR DETECTING CELIAC DISEASE

(54) **Título :** PÉPTIDO, PÉPTIDO MAGNÉTICO Y MÉTODO PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD CELÍACA

(57) **Abstract:** The invention relates to a peptide, to a magnetic peptide, and to a method for detecting celiac disease. The invention also relates to a deamidated peptide used to produce said magnetic peptide, and to the use of both for the detection of celiac disease. Said deamidated peptide comprises a histidine tail and is joined to a magnetic particle complex. The invention also relates to an immunosensor comprising said magnetic peptide, to a suitable method for detecting celiac disease based on a magnetic immunoassay, and to a kit comprising said magnetic peptide.

(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 desamidado que se emplea para preparar dicho péptido magnético, y al empleo de ambos para la detección de la enfermedad celíaca. Dicho péptido desamidado 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.

PÉPTIDO, PÉPTIDO MAGNETICO Y MÉTODO PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD CELÍACA

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.

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.

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.

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

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.

La prevalencia mundial se estima en 1/266, y en España oscila entre 1/18 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.

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 desamidados de gliadina (APDG).

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.

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.

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, (ÑIPO: 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.

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

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 desamidados 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 desamidación 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 desamidados ensayados fue mejor epítipo 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.

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 desamidada unida a una cola tal como la proteína glutatona-S-transferasa o His-tag, que puede incluir transaminasa tisular. Dicho antígeno se encuentra inmovilizado en partículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo.

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.

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.

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.

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

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.

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*, Puré & 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 desamidados 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.

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

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

De forma más preferida, el péptido de la invención se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),
 H₂N-(H)₆-LPFPQQPQQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 53),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEEPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 55),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₂-COOH (SEQ_ID_NO: 56),
 H₂N-(H)₄-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 57),
 H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 59),
 H₂N-LPFPEQPEQPFPEPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 60), y
 H₂N-(H)₂-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 61).

Aún más preferiblemente, el péptido de la invención se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),
 H₂N-(H)₆-LPFPQQPQQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 53),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54),
 H₂N-(H)₄-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 57),
 H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 59), y
 H₂N-(H)₂-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 61).

Todavía más preferiblemente, el péptido de la invención se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),

H₂N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54), y
 H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58).

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

Péptido desamidado	SEQ_ID_NO:
H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH	40
H ₂ N-LPFPQQPEQPFPQPEQPQ-COOH	41
H ₂ N-LPFPEQPQQPFPQPEQPQ-COOH	42
H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQQQPQ-COOH	43
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPPQPE-COOH	44
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPQEPQ-COOH	45
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPQPEQPQ-COOH	46
H ₂ N-LPFPQQPQQPFPEPQQPQ-COOH	47
H ₂ N-LPFPQQPQEPFPQPQQPQ-COOH	48
H ₂ N-LPFPQQPEQPFPQPQQPQ-COOH	49
H ₂ N-LPFPQEPQQPFPQPQQPQ-COOH	50
H ₂ N-LPFPEQPQQPFPQPQQPQ-COOH	51

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-LPFPEQPEQPFPQPEQPQK-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:

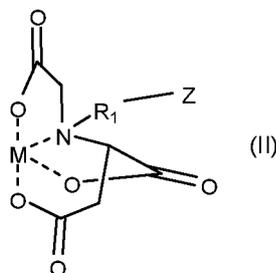
X es Q o E indistintamente, y al menos un X es E, y

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):



en donde:

Z es una partícula polimérica magnética unida covalentemente al ligando aspartato carboximetilado a través de FN1,

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.

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 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.

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

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.

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 (por ejemplo, estireno), acrilatos y/o metacrilatos. El polímero puede estar reticulado mediante la incorporación de agentes reticulantes como comonómeros, 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 comonómero 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 mieras, preferiblemente entre 0,5 y 50 mieras, más preferiblemente entre 0,8 y 8 mieras, y aún más preferiblemente entre 0,8 y 1,2 mieras.

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 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 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 F^Λ.

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 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 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, 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 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 R₁ 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-, -alquileo-O-, -alquileo-CO-O-, -alquileo-O-CO-, -alquileo-S-, -alquileo-CO-S-, -alquileo-S-CO-, -alquileo-NH-alquileo-R₂, -alquileo-NH-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-NH-alquileo-R₂, -alquileo-O-alquileo-R₂, -alquileo-O-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-O-alquileo-R₂, -alquileo-S-alquileo-R₂, -alquileo-S-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-S-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-NH-, -hidroxialquileo-

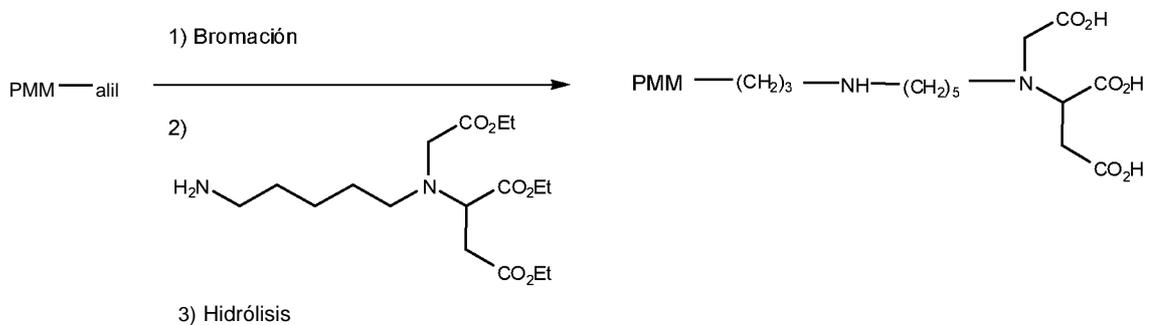
CO-NH-, -hidroxialquileno-NH-CO-, -hidroxialquileno-O-, -hidroxialquileno-CO-O-, -hidroxialquileno-O-CO-, -hidroxialquileno-S-, -hidroxialquileno-CO-S-, -hidroxialquileno-S-CO-, -hidroxialquileno-NH-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-NH-CO-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-CO-NH-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-O-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-O-CO-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-CO-O-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-S-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-S-CO-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-CO-S-alquileno-R₂, -alquileno-NH-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-NH-CO-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-CO-NH-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-O-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-O-CO-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-CO-O-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-S-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-S-CO-hidroxialquileno-R₂, y -alquileno-CO-S-hidroxialquileno-R₂, en donde R₂ es un grupo funcional de enlace y preferiblemente es O, S o NH, y más preferiblemente es NH.

Más preferiblemente R₁ se selecciona de entre -alquileno-NH-, -alquileno-CO-NH-, -alquileno-NH-CO-, -alquileno-O-, -alquileno-CO-O-, -alquileno-O-CO-, -alquileno-NH-alquileno-R₂, -alquileno-NH-CO-alquileno-R₂, -alquileno-CO-NH-alquileno-R₂, -alquileno-O-alquileno-R₂, -alquileno-O-CO-alquileno-R₂, -alquileno-CO-O-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-NH-, -hidroxialquileno-CO-NH-, -hidroxialquileno-NH-CO-, -hidroxialquileno-O-, -hidroxialquileno-CO-O-, -hidroxialquileno-O-CO-, -hidroxialquileno-NH-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-NH-CO-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-CO-NH-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-O-alquileno-R₂, -hidroxialquileno-O-CO-alquileno-R₂, -alquileno-NH-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-NH-CO-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-CO-NH-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-O-hidroxialquileno-R₂, -alquileno-O-CO-hidroxialquileno-R₂, y -alquileno-CO-O-hidroxialquileno-R₂. Aún más preferiblemente R₁ se selecciona de entre -alquileno-NH-alquileno-R₂, -alquileno-NH-CO-alquileno-R₂, -alquileno-CO-NH-alquileno-R₂, -alquileno-O-alquileno-R₂, -alquileno-O-CO-alquileno-R₂, y -alquileno-CO-O-alquileno-R₂; todavía más preferiblemente de entre -alquileno-NH-alquileno-R₂, y -alquileno-O-alquileno-R₂; aún más preferiblemente es -alquileno-NH-alquileno-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: CoCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , GaCl_2 , GaCl_3 , MnSO_4 , NiCl_2 , o ZnCl_2 .

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:



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 solicitud de patente WO-A-2007/089933.

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

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.

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

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, R_1 es el grupo $-(CH_2)_5-NH-(CH_2)_3-NH$, y M es Co^{2+} , en donde el grupo $(CH_2)_5$ 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.

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.

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).

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.

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).

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 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 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, (químico)luminiscentes, etc., todas ellas conocidas por los técnicos en la materia.

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:

- la fosfatasa alcalina: sustratos basados en p-nitrofenil fosfato (p-NPP) o 2-(5-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)quinazolinona (CPPCQ);
- peroxidasa: 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.
- 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

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), luminoimunoensayos, 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.

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

- 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
- 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. 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-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.

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 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 μL , preferiblemente entre 60 y 80 μL 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 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.

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.

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.

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.

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.

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

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), luminoinmunoensayos, 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

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.

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

$$SE = \frac{\textit{enfermos positivos}}{\textit{total enfermos}} = \frac{vp}{vp + fh}$$

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:

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

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 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 desamidados 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.

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

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, 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.

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 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.).

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 Zaceo *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 desamidado de gliadina (PDG) de secuencia HHHHHHLPFPEQPEQPFPQPEQPQ (99,2% pureza) (GenScript, Cat. n° 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 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 desamidado de gliadina (PDG) de secuencia HHHHHHLPFPEQPEQPFQPEQPQ (99,2% pureza) (GenScript, Cat. n° 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 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 $E = -0,050 \text{ V}$ (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 ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) como mediador y H_2O_2 ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) como sustrato.

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:

- 1) Primera 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 placas de microtitulación, en condiciones de agitación durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se realizaron tres lavados con 100 μL de PBST, aplicando un campo magnético entre los lavados con la finalidad de separar las PM modificadas del sobrenadante.

- 2) Segunda etapa de incubación: se adicionaron 100 μ I 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).
- 3) Se adicionaron a cada pocilio 100 μ I de solución TMB:H₂O₂ (1:1) y la placa se incubó durante 30 minutos en oscuridad, luego se agregaron 100 μ I de solución de parada (H₂SO₄ 2 M);
- 4) Finalmente se realizó la lectura de absorbancia de cada pocilio con un lector de placa a λ = 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.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos (sensibilidad, SE, y especificidad, ES) con el péptido magnético de la invención (Ejemplo 1) 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:

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 desamidados 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

Ejemplos 4 a 12: [Inmovilización de péptidos en partículas magnéticas Dynabeads® TALON®](#)

Se prepararon otros péptidos magnéticos acuerdo con un procedimiento sustancialmente análogo al procedimiento descrito en el Ejemplo 1, y cuyas secuencias se presentan a continuación en la Tabla IV:

TABLA IV

Ejemplo	Péptido	SEQ_ID_NO:
4	H ₂ N-(H) ₆ -LPFPQQPQQPFPQPQQPQ-COOH	53
5	H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-(H) ₆ -COOH	54
6	H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPEEPQ-(H) ₆ -COOH	55
7	H ₂ N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-(H) ₂ -COOH	56
8	H ₂ N-(H) ₄ -LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH	57
9	H ₂ N-(H) ₁₀ -LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH	58

10	H ₂ N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H) ₆ -COOH	59
11	H ₂ N-LPFPEQPEQPFPEPEQPQ-(H) ₆ -COOH	60
12	H ₂ N-(H) ₂ -LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH	61

Ejemplo 13: Ensayo comparativo de detección de la enfermedad celíaca con péptidos magnéticos de diferente secuencia

Se han ensayado comparativamente con un suero positivo y un suero negativo a enfermedad celíaca los péptidos magnéticos obtenidos en los ejemplos 1 y 4 a 12 con un procedimiento sustancialmente análogo al del Ejemplo 2. En la Tabla V se presentan los resultados obtenidos, expresadas como la relación entre la señal de la muestra positiva y de la muestra negativa, como el grado de diferenciación entre muestras positivas y negativa, indicando un valor de 1 la no capacidad de discriminar una muestra positiva de una negativa y valores mayores de 1 la capacidad de discriminarlas:

TABLA V

Ejemplo	SEQ_ID_NO:	Relación señal positivo/señal negativo
1	39	6,5
4	53	2,3
5	54	7,6
6	55	1,9
7	56	1,9
8	57	2,7
9	58	9,8
10	59	2,0
11	60	1,9
12	61	2,5

Los resultados obtenidos permitieron concluir que el inmunosensor con el péptido magnético del Ejemplo 9 presentó la mayor capacidad de diferenciación entre muestras positivas y negativas, seguido por los péptidos magnéticos de los ejemplos 5, 1, 8, 12, 4. y 10.

REIVINDICACIONES

1.- Péptido caracterizado porque 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.

2.- Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque m es 0 y n está comprendida entre 4 y 15, preferiblemente entre 6 y 10.

3.- Péptido según la reivindicación 2, caracterizado porque n es 0 y m está comprendida entre 4 y 15, preferiblemente entre 6 y 10.

4.- Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),
 H₂N-(H)₆-LPFQPPQPPFPQPPQPPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 53),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEEPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 55),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₂-COOH (SEQ_ID_NO: 56),
 H₂N-(H)₄-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 57),
 H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 59),
 H₂N-LPFPEQPEQPFPEPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 60), y
 H₂N-(H)₂-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 61)

5.- Péptido según la reivindicación 4, caracterizado porque se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),
 H₂N-(H)₆-LPFQPPQPPFPQPPQPPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 53),
 H₂N-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54),
 H₂N-(H)₄-LPFPEQPEQPFQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 57),

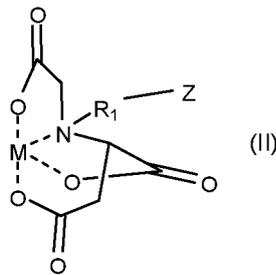
H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58),
 H₂N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 59), y
 H₂N-(H)₂-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 61).

6.- Péptido según la reivindicación 5, caracterizado porque se selecciona del grupo formado por:

H₂N-(H)₆-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 39),
 H₂N-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-(H)₆-COOH (SEQ_ID_NO: 54), y
 H₂N-(H)₁₀-LPFPEQPEQPFPQPEQPQ-COOH (SEQ_ID_NO: 58).

7.- Péptido magnético, caracterizado porque comprende:

- el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y
- un complejo magnético particulado de fórmula general (II):



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

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

8.- Péptido magnético según la reivindicación 7, caracterizado porque la partícula polimérica magnética está constituida por un polímero estirénico reticulado.

9.- Péptido magnético según las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque el brazo de unión R₁ 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-, -alquileno-O-CO-, -alquileno-S-, -alquileno-CO-S-, -alquileno-S-CO-, -alquileno-NH-alquileno-R₂, -alquileno-NH-CO-alquileno-R₂, -alquileno-CO-NH-alquileno-R₂, -alquileno-O-alquileno-R₂, -alquileno-O-CO-alquileno-R₂, -alquileno-CO-O-alquileno-R₂,

-alquileo-S-alquileo-R₂, -alquileo-S-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-S-alquileo-R₂, -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-R₂, -hidroxialquileo-NH-CO-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-CO-NH-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-O-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-O-CO-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-CO-O-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-S-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-S-CO-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-CO-S-alquileo-R₂, -alquileo-NH-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-NH-CO-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-CO-NH-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-O-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-O-CO-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-CO-O-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-S-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-S-CO-hidroxialquileo-R₂, y -alquileo-CO-S-hidroxialquileo-R₂, en donde R₂ es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

10.- Péptido magnético la reivindicación 9, caracterizado porque el brazo de unión R₁ se selecciona de entre -alquileo-NH-, -alquileo-CO-NH-, -alquileo-NH-CO-, -alquileo-O-, -alquileo-CO-O-, -alquileo-O-CO-, -alquileo-NH-alquileo-R₂, -alquileo-NH-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-NH-alquileo-R₂, -alquileo-O-alquileo-R₂, -alquileo-O-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-O-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-NH-, -hidroxialquileo-CO-NH-, -hidroxialquileo-NH-CO-, -hidroxialquileo-O-, -hidroxialquileo-CO-O-, -hidroxialquileo-O-CO-, -hidroxialquileo-NH-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-NH-CO-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-CO-NH-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-O-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-O-CO-alquileo-R₂, -hidroxialquileo-CO-O-alquileo-R₂, -alquileo-NH-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-NH-CO-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-CO-NH-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-O-hidroxialquileo-R₂, -alquileo-O-CO-hidroxialquileo-R₂, y -alquileo-CO-O-hidroxialquileo-R₂, en donde R₂ es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

11.- Péptido magnético según la reivindicación 10, caracterizado porque el brazo de unión R₁ se selecciona de entre -alquileo-NH-alquileo-R₂, -alquileo-NH-CO-alquileo-R₂, -alquileo-CO-NH-alquileo-R₂, -alquileo-O-alquileo-R₂, -alquileo-O-CO-alquileo-R₂, y -alquileo-CO-O-alquileo-R₂ en donde R₂ es O, S o NH, y preferiblemente es NH.

12.- Péptido magnético según la reivindicación 11, 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.

13.- Péptido magnético según la reivindicación 12, 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.

14.- Péptido magnético según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizado porque el metal de transición M se selecciona de entre el grupo formado por Ni, Fe, Ga, Mn, Co, Cu y Zn.

15.- Péptido magnético según la reivindicación 14, caracterizado porque el metal de transición M se selecciona de entre el grupo formado por Ni, Fe, Mn y Co.

16.- Péptido magnético según la reivindicación 15, caracterizado porque el metal de transición M es Co.

17.- Péptido magnético según la reivindicación 16, caracterizado porque el metal de transición tiene un estado de oxidación de +2.

18.- Péptido magnético según la reivindicación 7, caracterizado porque el complejo magnético particulado es *Dynabeads*[®] *TALON*[®].

19.- Inmunosensor caracterizado porque comprende el péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18 y un transductor que tiene acoplado o integrado un imán.

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

- 1) incubar una suspensión del péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18 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

3) medir la señal electroquímica u óptica obtenida a partir de la suspensión obtenida en el punto 2).

21.- Kit para detectar la enfermedad celíaca, caracterizado porque comprende el péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18.

22.- Uso del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para detectar la enfermedad celíaca.

23.- Uso del péptido magnético de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18 para detectar la enfermedad celíaca.

24.- Uso del inmunosensor de la reivindicación 19 para detectar la enfermedad celíaca.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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), pages: 2370-2375, the whole document	1-6, 22
Y		7-21, 23, 24
Y	WO 2005089933 A1 (DYNAL BIOTECH ASA [NO/NO]) 29.09.2005, page 1, lines 3-22; page 5, lines 7-28; page 18, line 28 - page 20, line 7.	7-18, 21, 23
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, pages: 46-52, the whole document.	19, 20, 24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
07/04/2015

Date of mailing of the international search report
(08/04/2015)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsímile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. García Grávalos

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070097

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20130109034 A1 (KUMAR V. ET AL.) 02.05.2103, page 2, paragraphs [0018] - [0020]; page 3, paragraphs [0026] - [0028].	1-24
A	US 20090311727 A1 (WATKINS MI ET AL.) 17.12.2009, page 2, paragraphs [0008] and [0009]; page 5, paragraphs [0046] - [0051]; claims 1-20.	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070097

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A sequence listing in an acceptable electronic form was already available to this Authority at the time of the international search, and for this reason the applicant was not invited to furnish it (PCT Rule 13ter.1).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070097

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2005089933 A1	29.09.2005	US2007299249 A1 JP2007529487 A EP1729880 A1 EP1729880 B1 DK1729880 T3 DE602005002732T2 AT374650T T	27.12.2007 25.10.2007 13.12.2006 03.10.2007 22.09.2008 07.08.2008 15.10.2007
----- US2013109034 A1	----- 02.05.2013	WO2011112792 A1 CA2798995 A1	----- 15.09.2011 15.09.2011
----- US2009311727 A1	----- 17.12.2009	EP2659901 A1 EP2659901 B1 ES2421719T T3 WO2009131909 A2 WO2009131909 A3 JP2011521898 A EP2276499 A2 EP2276499 A4 CA2721582 A1 AU2009239558 A1 AU2009239558 B2	----- 06.11.2013 21.01.2015 05.09.2013 29.10.2009 07.01.2010 28.07.2011 26.01.2011 08.02.2012 29.10.2009 29.10.2009 02.05.2013
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070097

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/415 (2006.01)

C07K17/14 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070097

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (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.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
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	1-6, 22
Y		7-21, 23, 24
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.	7-18, 21, 23
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.	19, 20, 24

IHI En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos **IHI** Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"¿fe" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
07/04/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
08 de abril de 2015 (08/04/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos

Nº de teléfono 91 3493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2015/070097

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	US 20130109034 A1 (KUMAR V. ET AL.) 02.05.2103, página 2, párrafos [0018] - [0020]; página 3, párrafos [0026] - [0028].	1-24
A	US 20090311727 A1 (WATKINS MI ET AL.) 17.12.2009, página 2, párrafos [0008] y [0009]; página 5, párrafos [0046] - [0051]; reivindicaciones 1-20.	1-24

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto I.c de la primera hoja)

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

en papel

en formato electrónico

b. Cuando

en la solicitud internacional tal y como se presentó

junto con la solicitud internacional en formato electrónico

posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

Esta Administración disponía, en el momento de la búsqueda internacional, de una lista de secuencias en formato electrónico por ella aceptada, por lo que en virtud de la Regla 13ter.I no se requirió que el solicitante la aportara.

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07K14/415 (2006.01)

C07K17/14 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)