

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Dezember 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2008/145084 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
C12N 15/62 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/000713
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
25. April 2008 (25.04.2008)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2007 025 291.0 30. Mai 2007 (30.05.2007) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): EUROIMMUN AG [DE/DE]; Seekamp 31, 23560  
Lübeck (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PROBST, Christian  
[DE/DE]; Einhauser Weg 15, 23909 Ratzeburg (DE).  
SCHLUMBERGER, Wolfgang [DE/DE]; Fuchsbau  
4, 23627 Gross Grönau (DE). STÖCKER, Winfried  
[DE/DE]; Am Sonnenberg 9, 23627 Gross Grönau (DE).  
DÄHNRIICH, Cornelia [DE/DE]; Fuchsbau 4, 23627  
Gross Grönau (DE). KOMOROWSKI, Lars [DE/DE];  
Ribeweg 3, 23909 Ratzeburg (DE). MOTHESS, Thomas  
[DE/DE]; Lessingstrasse 16, 04109 Leipzig (DE).
- (74) Anwälte: MORE, Solveig usw.; Uexküll & Stolberg, Be-  
selerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,  
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,  
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,  
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts  
— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-  
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom In-  
ternationalen Büro erhältlich

(54) Title: METHOD AND IMMUNE ABSORBENTS FOR THE SPECIFIC DETECTION AND ABSORPTION OF CELIAC  
DISEASE- AND HERPETIFORM DERMATITIS-ASSOCIATED ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND IMMUNABSORBENTEN ZUR SPEZIFISCHEN DETEKTION UND ABSORPTION  
ZÖLIAKIE- UND DERMATITIS HERPETIFORMIS ASSOZIIERTER ANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to fusion peptides that are derived from components of gliadin, to a method and reagents for  
the serological diagnosis of celiac disease or herpetiform dermatitis by way of assaying antibodies that are directed against modified  
gliadin. The invention also relates to methods and pharmaceutical compositions for treating said diseases by specific immunoab-  
sorption of these antibodies.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionspeptide, die sich von Komponenten des Gliadins ableiten, ein  
Verfahren und Reagenzien zur serologischen Diagnostik der Zöliakie bzw. der Dermatitis herpetiformis durch den Nachweis von  
gegen modifiziertes Gliadin gerichteten Antikörpern sowie Verfahren und pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung  
dieser Krankheiten durch spezifische Immunabsorption dieser Antikörper.



WO 2008/145084 A2

**Verfahren und Immunabsorbentien zur spezifischen Detektion und  
Absorption Zöliakie- und Dermatitis herpetiformis assoziierter  
Antikörper**

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionspeptide, die sich  
5 von Komponenten des Gliadins ableiten, Testreagenzien zum  
diagnostischen Nachweis von Antikörpern gegen diese Peptide  
und Verfahren zur Immunabsorption solcher Antikörper zur  
Therapie der Zöliakie und der Dermatitis herpetiformis.

**Stand der Technik:**

10 Bei Patienten mit Gluten-Unverträglichkeit (Gluten-sensitive  
Enteropathie; Kleinkinder: Zöliakie, Erwachsene: einheimische  
Sprue; Zöliakie wird im Rahmen der vorliegenden Anmeldung auch  
altersunabhängig und synonym zu Gluten-sensitiver Enteropathie  
15 verwendet) wird durch Verzehr Gluten-haltiger Getreideprodukte  
eine Schädigung der Dünndarmschleimhaut hervorgerufen. Es

kommt zu einer Zottenatrophie und zu funktionellen Störungen. Das klinische Bild ist geprägt von Diarrhoe und den Folgen der Malabsorption (insbesondere Gewichtsverlust, bei Kindern Wachstumsretardierung). Bei einigen Patienten mit Gluten-sensitiver Enteropathie besteht zusätzlich eine Dermatitis herpetiformis Duhring: eine chronische, mit Blasenbildung einhergehende Hauterkrankung, die aber auch für sich allein auftreten kann.

Einen wichtigen Beitrag zur Diagnose der Gluten-sensitiven Enteropathie und der Dermatitis herpetiformis Duhring liefert die Untersuchung zweier verschiedener Antikörper: Gegen Gliadin und gegen Gewebs-Transglutaminase. Sie sichert die klinische Diagnose ab und eignet sich darüber hinaus zur Verlaufskontrolle und zur Überwachung einer Gluten-freien Diät oder eines Gluten-Belastungstests. Eine spezifische Abtrennung dieser beiden Antikörper aus dem Plasma der Patienten kann einen positiven therapeutischen Effekt mit sich bringen.

Während der akuten Krankheitsphase der Gluten-sensitiven Enteropathie sowie bei Dermatitis herpetiformis sind meist Gliadin-Antikörper der Klassen IgA und IgG nachweisbar. Antikörper der Klasse IgM sind gelegentlich auch nachweisbar, in der Regel aber nur, wenn gleichzeitig auch Antikörper gegen Gliadin der Klassen IgA und IgG vorliegen.

Mit Beginn einer Gluten-freien Diät fallen die IgA-Antikörper gegen Gliadin innerhalb weniger Monate auf niedrige Werte ab, während Antikörper der Klasse IgG im allgemeinen länger persistieren. Permanent hohe IgA-Gliadin-Antikörperspiegel sprechen dafür, daß eine Gluten-freie Diät nicht eingehalten wird. Unter Gluten-Belastung kommt es im Falle eines Rezidivs innerhalb weniger Tage zu einem Anstieg der IgG-Antikörper gegen Gliadin, die IgA-Antikörper folgen etwas später.

Die physiologische Funktion der Gewebs-Transglutaminase besteht in der Katalyse der Ausbildung einer Isopeptid-Bindung zwischen einer  $\gamma$ -Carboxamid-Gruppe eines Glutamin- und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes extrazellulärer Matrixproteine, wodurch diese kreuzvernetzt werden (Aeschlimann et al. 2000  
5 Connective Tissue Res. 41:1-27; Gentile et al. 2002. Neurochem Int. 40:79-83).

Mit der Nahrung aufgenommene Glutamin-reiche Gliadine können nach der Resorption ebenfalls durch Gewebstransglutaminase  
10 modifiziert werden. Allerdings erfolgt hier vorzugsweise die enzymatische Desamidierung von Glutamin- zu Glutamat-Resten (zusammengefasst in Schwertz et al. 2004. Clinical Chemistry 50:2370-2375). Diese führt zu einer stärkeren Bindung von Gliadin-Peptiden an MHC-Klasse II Moleküle und dadurch zu  
15 einer gesteigerten T-Zell-Stimulation bei Patienten mit Zöliakie (Sjöström et al. 1998. Scand J Gastroenterol. 48:111-115; Molberg et al. 1998. Nat Med. 4:713-717).

Als wichtiges Epitop für Antikörper der Klasse IgA, insbesondere von Teilen des desamidierten Gliadins, wurde das  
20 Tripeptid Prolin-Glutamat-Glutamin (PEQ) identifiziert (Osman et al. 2000. Clin Exp Immunol. 121:248-254). Es wurde gezeigt, dass desamidiertes Gliadin spezifischer durch Antikörper von Zöliakie-Patienten erkannt wird als das unmodifizierte Gliadin (Aleanzi et al. 2001. Clin Chem. 47:2023-2028). Durch die  
25 Autoren wurde für den Nachweis von Antikörpern gegen ein desamidiertes, vom Gliadin abgeleitetes Peptid bei Zöliakie für Antikörper der Klasse IgA eine Sensitivität von 85,0% bei einer Spezifität von 86,7% und für Antikörper der Klasse IgG eine Sensitivität von 90,0% bei einer Spezifität von 86,7%  
30 hinsichtlich einer Zöliakie-Erkrankung ermittelt (siehe Tabelle 1,a).

Im Rahmen einer systematischen Analyse der Bindung Zöliakie-assoziierter Antikörper der Klasse IgA an synthetische, vornehmlich vom Gliadin abgeleitete Antigene wurden zwei Nonapeptide entsprechend der SEQ-ID NO 2 (Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro) und SEQ-ID NO 3 (Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu) als bestgeeignete Antigene identifiziert (Schwertz et al. 2004. Clinical Chemistry 50:2370-2375). Die Synthese dieser beiden Peptide (nach Kramer et al. 1998. J. Methods Mol. Biol. 87:25-39) erfolgte separat nebeneinander chemisch auf einer Zellulosemembran, die anschließend in einem Chemilumineszenztest direkt zur Bindung Zöliakie-assoziierter Antikörper eingesetzt wurde. Das Verfahren ist von der Herstellung Membranbasierter Peptid-Banken im Rahmen von Epitopmappingstudien bekannt. Entsprechende Reagenzien für den Antikörpernachweis führen bei der Produktion diagnostischer Testsysteme zu hohen Herstellungskosten.

Dessen ungeachtet haben Schwertz et al. zwei Membran-basierte ELISA zum Nachweis von Antikörpern der Immunglobulinklasse IgA gegen Gliadin bei Zöliakie mit Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt, die in der kombinierten Auswertung beider Antigene entsprechend SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 zusammen (siehe Tabelle 1, b) eine Sensitivität von 94,2% bei einer Spezifität von 93,4% aufwiesen.

Die Chemilumineszenzdetektion ist aufwändig und auf teure Analysegeräte angewiesen. Es wurde nicht gezeigt, ob die erhobenen diagnostischen Leistungsdaten auch mit den mehrheitlich verbreiteten kolorimetrischen Detektionsverfahren zu erzielen sind. Die Autoren selbst weisen auf diesen Nachteil hin und schlagen zur weiteren Verbesserung ihres Testsystems eine erneute Sequenzoptimierung sowie die Überführung des Membranbasierten Chemilumineszenztestsystems auf das Mikrotiterplattenformat vor, ohne diese Aufgabe gelöst zu haben.

Schwartz et al. haben nur Gewebstransglutaminase-IgA-positive Seren in die Studie einbezogen. Proben von Patienten mit selektivem IgA-Mangel führen bei Schwartz et al. nicht zu einer Verringerung der Sensitivität wie bei ergebnisoffener Patientenauswahl, sodass hier eine ungerechtfertigt zu hohe Sensitivität in der Größenordnung von 3-5% anzunehmen ist. Die Leistungsdaten basieren außerdem auf einer kombinierten Auswertung der mit zwei separaten und auf den Peptidsequenzen nach SEQ ID NO 2 bzw. SEQ ID NO 3 basierenden, schlecht routinetechnischen Bestimmungen.

Ein Mikrotiterplatten-basierter ELISA zur Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgG auf Basis eines (gemäß der Sequenz SEQ ID NO 2) der beiden Nonapeptide wies in einer Studie (Prause et al. 2007, Posterbeitrag zur 22. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung, Bochum) ebenfalls eine Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik für die Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgG auf, für IgA wurden keine Ergebnisse gezeigt (siehe Tabelle 1, c).

In der Studie von Schwartz et al. hat sich gezeigt, dass die getrennt durchgeführte aber kombiniert ausgewertete Antikörperbestimmung unter Einsatz der Peptide gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 eine Verbesserung der serologischen Zöliakie-Diagnostik ermöglicht. Die Leistungsdaten der Arbeit von Aleanzi et al. wurden von Schwartz et al. deutlich übertroffen. Bei Schwartz et al. müssen aber mindestens zwei getrennte Synthesen und Bestimmungen (Antigene entsprechend SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) separat durchgeführt werden, was den doppelten Material- und Arbeitsaufwand verursacht. Es wäre möglich, die beiden Peptidantigene zu mischen und das Gemisch zur Beschichtung der Festphase im ELISA einzusetzen. Solche Tests leiden aber an mangelnder Reproduzierbarkeit, einer Zunahme der unspezifischen Reaktionen und zu gegenseitiger sterischer Behin-

derung bei der Bindung der antigenen Komponenten an die Oberfläche.

	Immunglobulin-Klasse	Sensitivität	Spezifität	Quelle
a	IgA	85,0%	86,7%	Aleanzi et al., 2001
	IgG	90,0%	86,7%	SEQ ID NO 1
b*	IgA	≤ 94,2%	93,4%	Schwartz et al., 2004
	IgG	nicht ausreichend?	nicht ausreichend?	SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3
c	IgA	nicht ausreichend?	nicht ausreichend?	Prause et al., 2007
	IgG	95,0%	94,7%	SEQ ID NO 2

\* inkorrekte vorselektierte Patientenauswahl

5 **Tabelle 1:** Zusammenstellung der publizierten Leistungsdaten von Testsystemen basierend auf desamidierten Gliadin-homologen Peptidantigenen.

10 Aufgabe der Erfindung war es, die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik zu überwinden und ein besser routine-taugliches Antikörper-Testsystem für die Diagnose der Zöliakie bereitzustellen, welches kompetente Resultate liefert.

Beschreibung der Erfindung:

15 Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der Ansprüche, insbesondere durch die im Folgenden beschriebenen Fusionspolypeptide gelöst.

Aus dem Stand der Technik lässt sich ableiten, dass mit Hilfe der Einzelpeptide nach SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 eine kompetente Diagnose der Zöliakie möglich ist. Wir synthetisierten diese beiden Peptide deswegen zunächst chemisch in biotinylierter Form und setzten sie zur Beschichtung von Mikrotiterplatten ein. Durch den Nachweis gebundenen Biotins konnte sichergestellt werden, dass die Peptide sich an die Oberfläche gebunden hatten, allerdings gelang es nicht, die aus dem Stand der Technik abgeleiteten diagnostischen Leistungsparameter nachzuvollziehen. Daraufhin stellten wir die Versuche mit den chemisch synthetisierten Peptiden gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 ein.

Als Alternative zur chemischen Synthese wäre es möglich gewesen, die Peptide gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 rekombinant zu exprimieren (siehe Beispiele 1 und 2), und zwar in der Form mehrerer fusionierter, jeweils durch Methioninreste voneinander getrennte Kopien, im Bereich derer mittels Bromcyan gespalten werden könnte, um sie zu vereinzeln. Dann hätte man die Komponenten aufgetrennt, jeweils einzelne ELISA durchgeführt und parallel für die Diagnostik eingesetzt oder man hätte mit der Mischung beschichtet.

Die Erfinder haben aber die Idee verfolgt, die Peptide gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 zu einem neuen Fusionspeptid gemäß SEQ ID NO 4 (Pro Leu Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Glu Gln Leu Pro Gln Phe Glu Glu) zusammensetzen. Von diesem Fusionspeptid sollten mehrere Kopien aneinandergesetzt synthetisiert und nach erfolgter rekombinanter Synthese die Peptide wieder vereinzelt werden. Wir synthetisierten eine entsprechende DNA und integrierten sie in trimerer Form in ein *E.coli*-Expressionsplasmid, sodass wir das zirkuläre Plasmid gemäß SEQ ID NO 6 erhielten (siehe Beispiel 1). Mit Hilfe dieses Plasmids konnten wir das im Folgenden als Trimer bezeichnete

Polypeptid gemäß SEQ ID NO 7 in *E. coli* exprimieren, aufreinigen (siehe Beispiel 2) und anschließend, wie erwartet, durch Behandlung mit Bromcyan spalten. Das Spaltprodukt (Monomer) setzten wir zur Beschichtung von Mikrotiterplatten ein. Parallel dazu führten wir Kontrollen mit dem ungespaltenen Trimer unter identischen Bedingungen durch. Überraschenderweise erzielten wir im ELISA mit kolorimetrischer Detektion (siehe Beispiel 3) mit dem Trimer als Antigen substrat wesentlich bessere Leistungsdaten für die Immunglobulinklasse IgG zur Identifizierung der Zöliakie-Patienten als mit Testsystemen des bereits hoch entwickelten Standes der Technik (siehe Tabelle 2).

Auch mit Monomeren, die durch Spaltung aus dem Trimer gewonnenen wurden, ließen sich in Vorversuchen die Leistungsdaten der ELISA-Systeme des Standes der Technik bereits übertreffen, die weitaus besten Ergebnisse wurden aber mit dem ungespaltenen Trimer erreicht. Peptidantigene aus mehr als 3 Polypeptidsequenzen gemäß SEQ ID NO 4 können ebenfalls überragende Leistungsdaten erzielen

Zur Ermittlung der Leistungsdaten des ELISA basierend auf dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO 7 (Trimer) führten wir im Folgenden eine Studie mit Serumproben von Personen mit biopsisch gesicherter positiver bzw. negativer Zöliakiediagnose durch (siehe Beispiel 3). Im Unterschied zu Schwertz et al. wurde das Kollektiv nicht vorselektiert, d.h. Patienten mit selektivem IgA-Mangel wurden nicht ausgeschlossen. Das Kollektiv setzte sich folgendermaßen zusammen:

Gruppe 1: Zöliakiepatienten ohne spezielle Diät zum Zeitpunkt der Biopsie (Marsh 2-3). Diese Gruppe umfasst auch Patienten mit Dermatitis herpetiformis.

Gruppe 2: Patienten mit Dermatitis herpetiformis, bei denen keine Zöliakie bekannt ist.

Gruppe 3: Patienten, bei denen die bioptische Untersuchung gegen eine Zöliakie spricht (Marsh 0).

- 5 Gruppe 4: Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa), bei denen eine dünndarmbiotische Untersuchung erfolgte und in der keine zöliakietytische Veränderungen beschrieben wurden.

Die Gruppe 1 wurde als klinisch gesicherte Zöliakie-Positiv-,  
10 die Gruppe 2 als klinisch gesicherte Dermatitis herpetiformis-Positiv- und die Gruppen 3 und 4 als Negativkontrollgruppen zur Ermittlung der Leistungsparameter durch Signal-Analyse mittels "Receiver Operating Characteristic"-Kurven (ROC)-Analyse eingesetzt.

- 15 Ergebnisse: Wie in **Tabelle 2** wiedergegeben, zeigte sich, dass der ELISA basierend auf dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO 7 eine höhere Sensitivität und Spezifität für den Nachweis Zöliakiespezifischer Antikörper der Klasse IgG aufweist als der von Prause et al. beschriebene Test. Darüber hinaus ist mit dem  
20 gleichen erfindungsgemäßen ELISA auch eine qualitativ hochwertige Bestimmung von Antikörpern der Klasse IgA möglich.

Wir konnten zeigen, dass sich durch das Zusammenfügen der Peptidsequenzen gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 zu einem Peptid gemäß SEQ ID NO 7 Antigene herstellen lassen, die sich als  
25 Substrate für robuste, einfach zu produzierende ELISA mit kolorimetrischer Detektion eignen. Mit Testsystemen, die Antigensubstrate gemäß der Erfindung enthalten, können Zöliakieassoziierte Antikörper gegenüber dem Stand der Technik einfacher, sicherer und mit höherer Genauigkeit bestimmt werden.  
30 Darüberhinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren auch

die spezifische Bestimmung von Antikörpern der Klassen IgA und IgG bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis (siehe **Tabelle 2**).

		Sensitivität	Spezifität
Zöliakie	IgA	80,8%	94,6%
	IgG	98,0%	96,0%
Dermatitis herpetiformis	IgA	66,7%	94,6%
	IgG	66,7%	96,0%

**Tabelle 2:** Leistungsparameter des erfindungsgemäßen ELISA hinsichtlich der Diagnose einer Zöliakie bzw. einer isolierten Dermatitis hepetiformis.

In Bezug auf die Diagnostik der Zöliakie erzielten wir mit einem Reagenz entsprechend der Erfindung (Variante SEQ ID NO 7, Trimer) für den Nachweis Zöliakie-assoziiierter Antikörper der Klasse IgG eine Sensitivität von 98,0% bei einer Spezifität von 96,0%. Diese Werte liegen deutlich über den bisher besten publizierten Daten (Prause et al.: Sensitivität 95,0%, Spezifität 94,7%).

Was Antikörper der Klasse IgA betrifft, beträgt die Sensitivität 80,8% und liegt damit unter den von Aleanzi et al. und Schwertz et al. (siehe **Tabelle 1 a und b**) publizierten Daten. Aleanzi et al. haben jedoch eine ungenügende Spezifität von 86,7% erzielt und liegen daher, Spezifität und Sensitivität zusammen genommen, hinsichtlich des IgA gleichauf mit unseren Ergebnissen. Die Werte von Schwertz et al. können außerdem nur bedingt zum Vergleich herangezogen werden, weil das Patientenkollektiv vorselektioniert war. Der Verzicht auf Patientenproben mit selektivem IgA-Mangel (ca. 3% der an Zöliakie Erkrankten; Challacombe et al. 1995, Arch. Dis. Childhood 73:3-7;

siehe Anmerkung zu Tabelle 1) spiegelt bei Schwertz et al. eine zu hohe diagnostische Sensitivität vor, die in einem nicht vorselektionierten Kollektiv so nicht zu reproduzieren ist. Außerdem ist das Testsystem von Schwertz et al. nicht für eine  
5 industrielle Produktion einsetzbar.

Für die Immunglobulinklasse IgG wurde die Überlegenheit eines der Zielantigene gemäß der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik eindeutig bewiesen. Da nach aller Erfahrung bei Zöliakie und Dermatitis herpetiformis die Antikörper gegen Gliadin  
10 der Immunglobulinklassen IgA und IgG gegen gleiche Antigenepitope gerichtet sind, ist davon auszugehen, dass auch für IgA bei Verwendung des Probenmaterials identischer Patientenkollektive in den Testsystemen des Standes der Technik und der vorliegenden Erfindung für letztere die besten Leistungsparameter ermittelt werden können.  
15

Antigene gemäß der Erfindung sind technisch einfach, in ausreichender Menge und bester Qualität herstellbar. Sie lassen sich ohne weiteres an definierte Oberflächen binden. Sie eignen sich, unter anderem, aber nicht ausschließlich, für Festphasenimmuntests und immunaffinitätschromatographische therapeutische Verfahren.  
20

Gegenstand der Erfindung sind Fusionspolypeptide, die Peptidsequenzen entsprechend SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 in beliebiger Reihenfolge enthalten. Dabei können an beliebiger  
25 Stelle bis zu 30 % der Aminosäuren entfernt oder gegen beliebige Aminosäuren ausgetauscht sein, wobei die Aktivität des Fusionspolypeptids vergleichbar bleiben sollte, insbesondere die Bindung von Zöliakie- und Dermatitis herpetiformis-spezifischen Antikörpern. Insbesondere kann das Fusionspolypeptid  
30 1, 2, 3, 4 oder 5 Aminosäureaustausche, insbesondere konservative Aminosäureaustausche, oder Deletionen enthalten (verteilt

auf beide Sequenzen, insbesondere 1, 2, oder 3 Aminosäureaustausche oder Deletionen pro Sequenz.

Selbstverständlich kann das Fusionspolypeptid auch weitere Sequenzen enthalten. In einer Ausführungsform ist mehr als 50%  
5 des Peptids einer der Sequenzen nach SEQ ID NO 2 oder 3 zuzuordnen. Insbesondere können bis zu 30% oder bis zu 40% beliebiger Aminosäuren hinzugefügt werden. Diese können z.B. einer leichteren Aufreinigung des Peptids (z.B. His-Tag, Flag-Tag o.ä.), einer besseren Stabilität oder einer leichteren  
10 Zugänglichkeit für Antikörper dienen (z.B. als Spacer zwischen den Epitop-Sequenzen). Selbstverständlich können auch weitere für die Diagnose oder Therapie von Zöliakie und/oder Dermatitis hepatoformis nützliche Epitope, z.B. aus Gewebstransglutaminase, enthalten sein.

15 Die Fusionspolypeptide können alternativ auch nur eine Kopie der jeweiligen Peptidsequenzen enthalten, insbesondere enthalten sie aber Peptidsequenzen entsprechend SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO 3, d.h., jeweils eine Mehrzahl an Kopien. Bevorzugt umfassen solche Fusionspolypeptide zwei oder mehr,  
20 insbesondere drei oder mehr oder drei bis zwanzig oder 4 bis 10 Kopien der jeweiligen Sequenzen. Dabei kann die Anzahl der Kopien von SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 gleich oder auch unterschiedlich sein, und die Sequenzen können sich zum Teil überschneiden, müssen dies aber nicht. Zum Beispiel können 2  
25 Kopien von SEQ ID NO 2 und 3 Kopien von SEQ ID NO 3 vorliegen oder umgekehrt.

Die kleinste Einheit des bevorzugten erfindungsgemäßen Polypeptids enthält die durch Schwertz et al. beschriebenen Peptide gemäß SEQ ID 2 und SEQ ID 3 in einer sich überschneidenden Sequenz gemäß SEQ ID NO 4.  
30

Es müssen daher im Vergleich zu Schwertz et al. keine zwei Tests parallel angesetzt werden. Multimere Formen der erfindungsgemäßen Einheit, insbesondere der kleinsten Einheit bieten, nachdem sie an eine Oberfläche gekoppelt wurden, eine höhere Sicherheit als monomere Formen, da ausreichend Epitope für die Reaktion mit den spezifischen Antikörpern zur Verfügung stehen und immer noch welche übrig bleiben, wenn Bereiche des Polypeptids für die Bindungsreaktion an die Oberfläche unzugänglich geworden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung gegenüber dem Stand der Technik nochmals erreichte Qualitätssprung ist wahrscheinlich am größten bei den neuen Peptidsequenzen gemäß SEQ ID NO 4 bzw. SEQ ID NO 7. Diese Peptidsequenzen sind gegenüber dem Stand der Technik als neue Qualität anzusehen. Gegenstand der Erfindung sind auch Polypeptide mit mehr oder weniger als drei Kopien des Peptids gemäß SEQ ID NO 4, insbesondere mit 2 oder mehr, drei oder mehr oder 4 oder mehr Kopien, sowie von Teilpeptiden bestehend aus mindestens zehn, mindestens 14, mindestens 15 oder mindestens 16 in SEQ ID NO 4 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, da diese sich wie das Polypeptid gemäß SEQ ID NO 7 einsetzen lassen und bevorzugt eine vergleichbare Bindung der Antikörper zeigen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind auch Fusionspolypeptide aus den in beliebiger Reihenfolge und Anzahl zusammengesetzten Polypeptiden gemäß SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3, sowohl mit als auch ohne Sequenzüberschneidungen, da auch hierfür dem Fusionspolypeptid gemäß SEQ ID NO 4 vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich der Bindung Zöliakie- und Dermatitis herpetiformis spezifischer Antikörper zu erwarten sind.

Dem Fachmann ist bekannt, dass sich physikochemisch ähnliche Derivate aus den bisher beschriebenen Polypeptiden durch eine

oder mehrere konservative Aminosäureaustausche (Glutamat zu Aspartat E->D, Glutamin zu Asparagin Q->N, Phenylalanin zu Tyrosin F->Y, Leucin zu Isoleucin L->I) an beliebigen Positionen generieren lassen. Auch solche Derivate sind Gegenstand  
5 der Erfindung und im Rahmen der Erfindung immer mit eingeschlossen, da vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich der Bindung Zöliakie- und Dermatitis herpetiformis spezifischer Antikörper zu erwarten sind. Unter vergleichbaren Eigenschaften versteht der Fachmann eine ähnliche Spezifität und Sensitivität, insbesondere für den diagnostischen Nachweis von  
10 Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis wie in Tabelle 2 für den Nachweis von IgA und/oder von IgG angegeben (- 2% oder besser oder bevorzugt - 1% oder besser), insbesondere ist die Bindung der Antikörper also mit der Bindung an das  
15 Fusionspolypeptid nach SEQ ID NO: 7 vergleichbar. Insbesondere können bis zu 10%, bis zu 20% oder bis zu 30% der Aminosäuren durch einen oder mehrere konservative Aminosäureaustausche ausgetauscht sein, wobei die Bindung von Zöliakie und Dermatitis herpetiformis spezifischen Antikörpern vergleichbar ist.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes Polypeptid mindestens eine und maximal 20 Kopien der Sequenz gemäß SEQ ID NO 4. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes Polypeptid mindestens zwei und maximal zehn Kopien der Sequenz gemäß SEQ  
25 ID NO 4 oder mindestens drei Kopien der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 4. In einer anderen Ausführungsform wird ein Gemisch unterschiedlicher erfindungsgemäßer Polypeptide eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide können auch in der Form von Polymeren vorliegen, insbesondere Polymere, die 2 bis  
30 20 oder 3 bis 10 erfindungsgemäße Fusionspolypeptide umfassen. Diese müssen nicht durch eine Peptidbindung miteinander verbunden sein, sondern können auch auf andere Weise (z.B.

über eine Verbindungsgruppe) kovalent gekoppelt oder nicht-kovalent assoziiert sein.

Für den Fachmann ergeben sich weitere Verfahren zur Herstellung, Aufreinigung und Isolierung der erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptide, mit oder ohne Fusionspartner, wie etwa 5 Filtrations-, Chromatographie-, Elektrophorese- und Zentrifugationsverfahren oder Kombinationen aus diesen. Solche Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen sind z.B. in Lottspeich und Zorbas beschrieben (Bioanalytik, 1998, Spektrum akademischer 10 Verlag, Heidelberg, Berlin) oder Sambrook et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch mit solchen Verfahren hergestellte, aufgereinigte oder isolierte erfindungsgemäße Polypeptide. In einer 15 bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid in *E. coli* rekombinant hergestellt.

Gegenstand der Erfindung sind daher auch Nukleinsäuren (DNA oder RNA), welche für ein oder mehrere erfindungsgemäße Fusionspolypeptide kodieren, z.B. für ein Polypeptid umfassend 20 das Peptid gemäß SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 7. Diese können in einem Expressionsvektor unter Kontrolle eines heterologen Promotors vorliegen. Der Expressionsvektor kann in einer Wirtszelle enthalten sein. Es hat sich im Rahmen der Erfindung herausgestellt, dass z.B. *E. coli* zur Expression der erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide geeignet ist. 25

Gegenstand der Erfindung sind auch mit einem Reporter-molekül markierte erfindungsgemäße Polypeptide. Als chemische Koppelungsverfahren sind dem Fachmann eine Reihe unterschiedlicher Verfahren wie solche, die die Reporter-moleküle zunächst mit 30 einer reaktiven Gruppe, bspw. Pentafluorphenylester, N-Hydroxysuccinimid oder Maleimid, versehen und die so aktivierten

Reporter-moleküle dann mit dem zu markierenden Zielmolekül, bspw. einem Antigen oder Protein, in Kontakt bringen, bekannt. Nach der Verbindung von Reporter-molekül und Zielmolekül kann überschüssiges Reporter-molekül anschließend durch chemische, biochemische oder physikalische Trenntechniken, bspw. Chromatographie oder Filtration, entfernt werden. Als Reporter-moleküle sind dem Fachmann eine Reihe unterschiedlicher Verbindungen wie Fluorophore, bspw. Fluorescein oder Tetramethylrhodamin, Haptene, bspw. Biotin oder His-Tag und Enzyme, bspw. Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase, bekannt. Zur Nutzung der verschiedenen Kopplungsverfahren sind zu diesem Zweck bereits aktivierte Reporter-moleküle kommerziell erhältlich. Der Fachmann kennt weitere Reporter-moleküle und Kopplungsverfahren zur Markierung von Proteinen. Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch mit solchen Verfahren hergestellte mit Reporter-molekülen markierte erfindungsgemäße Polypeptide.

Gegenstand der Erfindung sind auch erfindungsgemäße Fusionspolypeptide, die mit einer festen Phase (z.B. einem Träger aus Plastik wie einer Mikrotiterplatte, einem magnetischen Kügelchen, einer Membran z.B. aus Nitrozellulose) direkt oder indirekt verbunden sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Diagnose von Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis, bei denen eine flüssige biologische Probe eines Patienten (insbesondere Blut, Plasma oder eine optional mit Wasser oder einem geeigneten Puffer verdünnte Stuhlprobe) mit erfindungsgemäßen Polypeptiden in Kontakt gebracht wird und die Bindung von Antikörpern aus der biologischen Probe an diese Polypeptide erfolgt oder erfolgen kann, wobei durch den Nachweis dieser Antikörper gegen eines dieser Polypeptide eine Zöliakie oder Dermatitis herpetiformis diagnostiziert wird. Bei diesen Verfahren kann

ein Gemisch aus mindestens zwei verschiedenen erfindungsgemäßen Polypeptiden verwendet werden.

Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide besonders geeignet zur Durchführung immunologischer Verfahren wie etwa Westernblot, LinienBlot, Dot-Blot oder Immunfluoreszenztest sind. Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch solche Verfahren, bzw. Diagnoseverfahren, bei denen die Bindung der Antikörper mit einem Immunfluoreszenztest, Microarray, ELISA, Lumineszenztest, Blot, Radioimmuntest, Western Blot oder Dot Blot nachgewiesen wird.

Die Erfindung stellt auch einen Testsatz zum Nachweis von Antikörpern zur Verfügung, der ein oder mehrere erfindungsgemäße Fusionspolypeptide umfasst. Dieser ermöglicht z.B. die Durchführung eines erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens. Ein solcher Testsatz kann auch sekundäre Antikörper enthalten, z.B. anti-human IgA und/oder anti-human IgG-Antikörper, die optional mit einem Reportermolekül markiert sein können. In einer Ausführungsform umfasst der Testsatz ferner Antigene, die zusätzlich zur Diagnose der Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis geeignet sind, etwa Gewebstransglutaminase oder Polypeptide mit Epitopen daraus, die zur Diagnose geeignet sind. Damit kann der Testsatz z.B. zu einem kombinierten Test verwendet werden, in dem IgA-Antikörper gegen Gewebstransglutaminase und IgG-Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide nachgewiesen werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind therapeutische Verfahren zur Entfernung Zöliakie-spezifischer Antikörper aus Blut oder Blutplasma, vorzugsweise von Patienten mit Zöliakie und Dermatitis herpetiformis. Dieses kann beispielsweise durch ex vivo Immunadsorption (Immunapherese) an immobilisierte erfindungsgemäße Polypeptide erfolgen (gemäß Beispiel 4).

Durch In-Kontakt-bringen mit dem Blut oder Plasma werden die für die immobilisierten Polypeptide spezifischen Antikörper entfernt, und die Körperflüssigkeit kann anschließend wieder reinfundiert werden. Entsprechende Verfahren sind z.B. zur  
5 Therapie der dilatativen Kardiomyopathie auf Basis der Sequenz des beta-adrenergen Rezeptors beschrieben (Rönspeck et al. 2003 Ther Apher Dial. 7:91-97). In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO 7 durch chemische Kopplung an einer festen Matrix immobilisiert und als  
10 Grundlage für einen Immuntest oder ein therapeutisches immunaffinitätschromatographisches Absorptionsverfahren eingesetzt.

Die Erfindung stellt damit ein Verfahren zur Therapie von Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis bereit, bei dem Blut oder Plasma eines Patienten mit einem oder mehreren festphasengebundenen, erfindungsgemäßen Polypeptiden in Kontakt  
15 gebracht wird, die Bindung der krankheitsassoziierten Antikörper aus dem Blut oder Plasma an diese Polypeptide erfolgt, wobei das Antikörper-abgereicherte Blut oder Plasma zur Reinfusion an den Patienten geeignet ist. In einer Ausführungsform  
20 werden die erfindungsgemäßen Fusionspolypeptide hierbei in Kombination mit Polypeptiden mit Epitopen der Gewebstransglutaminase verwendet.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines oder mehrerer der beschriebenen Fusionspolypeptide zur Herstellung einer  
25 pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere zur Therapie der Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis. Diese pharmazeutische Zusammensetzung ist insbesondere zur Bindung /Absorption von Antikörpern verschiedener Klassen (IgA, IgG) aus Patientenblut oder -plasma geeignet.

**Beispiel 1: Klonierung von pET24e-(Gliadin-rd)<sub>3</sub>**

Herstellung des Vektorfragmentes:

Zunächst wurde die unikale AdeI-Schnittstelle des Plasmides pET24d (Novagen) zerstört. Die Abtrennung der 3'-Einzelstrang-  
5 überhänge nach AdeI-Linearisierung des pET24d-Plasmides wurde durch PfU-Polymerase (Fermentas) in Abwesenheit von dNTP's katalysiert. Anschließend erfolgte die Religation des Vektorfragmentes durch T4-DNA-Ligase (Fermentas). Diese Plasmid-DNA wurde anschließend mit Hilfe der DNA-Oligonukleotidprimer  
10 sense pET24e (SEQ ID NO 8) und asense pET24e (SEQ ID NO 9) amplifiziert und nach AdeI-Restriktion und Dephosphorylierung der 5'-Enden als pET24e-Vektorfragment zum Einbau der für die vom partiell desamidierten Gliadin abgeleitete synthetische DNA-Sequenz eingesetzt.

15 Mit Hilfe der 5'-phosphorylierten DNA-Oligonukleotide sense dpGlia (SEQ ID NO 10) und asense dpGlia (SEQ ID NO 11) wurde eine Linkersequenz generiert, die AdeI-kompartible 5'-phosphorylierte Überhänge trägt und über diese gerichtet in das AdeI-geschnittene und dephosphorylierte pET24e-Vektorfragment  
20 mit Hilfe von T4-DNA-Ligase (Fermentas) ligiert.

Die Linker-Hybridisierung erfolgte im 50 µl Ansatz folgender Zusammensetzung:

75 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C)  
20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
25 0.01 % (v/v) Tween 20;  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µM sense Glia-dp (SEQ ID NO 10)  
1 µM asense Glia-dp (SEQ ID NO 11)

Der Ansatz wurde 1 Minute bei 95°C inkubiert und anschließend

mit einer Temperaturerniedrigungsrate von 2 °C pro Minute auf 25°C gekühlt.

Die hybridisierten Linker-Fragmente wurden unter Verwendung des NucleoSpin® Extract II-Aufreinigungssystems (MACHEREY-NAGEL  
5 GmbH & Co. KG) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in jeweils 50 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen.

Die Linker tragen beidseitig einen 3'-ATG-Überhang, wodurch ein gerichteter Einbau in den AdeI-geschnittenen pET24e-Vektor möglich ist.

10 Die 5'-phosphorylierten und aufgereinigten Linker-Fragmente wurden anschließend in AdeI-geschnittenes pET24e-Plasmid durch Ligation integriert. Zur Ligation wurde das Rapid DNA Ligation Kit der Firma Fermentas entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde anschließend in  
15 *E.coli* BL21(DE3) (Stratagene) transformiert.

Positive Klone werden aufgrund der Kanamycin-Resistenz [50 µg/ml] selektiert. Aus diesen Klonen werden die enthaltenen Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung überprüft. Die für das rekombinante Protein  
20 (Gliadin analoges Fusionspeptid GAF(3X)) nach SEQ ID NO 7 kodierende DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO 5 und die DNA-Sequenz des gesamten Expressionsplasmides mit der Bezeichnung pET24e-GAF(3X) ist in SEQ ID NO 6 dargestellt. Korrekte Plasmide wurden für die Durchführung der Expression ausgewählt, in  
25 ml antibiotikahaltigem LB-Medium inokkuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> (d=1 cm) von 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) wird die Proteinexpression induziert und anschließend für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Zellen durch Zen-  
30 trifugation bei 2.200 x g für 10 Minuten sedimentiert, in 20

ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgt durch Zugabe von einem Drittel Volumen 4 x NuPAGE-LDS-Probenpuffer (Invitrogen), gefolgt von  
5 einer 10 minütigen Inkubation bei 70°C. Chromosomale DNA wird anschließend durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Stufe 7, MicroTip) fragmentiert.

Das Zellysate wird nach der Trennung durch SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend werden unab-  
10 gesättigte Positionen der Membran durch eine 15 minütige Inkubation mit „Universalpuffer“ (EUROIMMUN) mit 3% (w/v) Milchpulver blockiert. Anschließend wird 1 Stunde mit einem gegen den His-Tag gerichteten und 1:2000 in „Universalpuffer“ mit 3% (w/v) Milchpulver verdünnten monoklonalen Antikörper aus der  
15 Maus (Merck Biosciences GmbH) inkubiert. Dann wird dreimal jeweils 5 Minuten mit „Universalpuffer“ gewaschen. In einem zweiten Inkubationsschritt reagieren die im positiven Fall an die Proteine gebundenen Antikörper mit einer 1:2000 in „Universalpuffer“ verdünnten Konjugat-Lösung, die als Konjugat ein  
20 alkalische Phosphatase-markierte Anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma) enthält. Anschließend wird wie nach der Seruminkubation gewaschen. In einem dritten Inkubationsschritt werden dann die gebundenen Antikörper mit einer NBT/BCIP-„Substrat-Lösung“ (4-Nitrobluetetrazoliumchlorid / Chlorobromoindolyl-  
25 phosphate, EUROIMMUN) nachgewiesen.

Im Westernblot kann im Falle der Expression des (GAF)<sub>3</sub>(His)<sub>6</sub>-Konstruktes gemäß SEQ ID NO 7 ein His-Tag-reaktives Protein nachgewiesen werden, dessen Größe gut mit der auf Basis der Aminosäuresequenz vorhergesagten Masse von 7,9 kDa überein-  
30 stimmt. Zellen die den unveränderten Plasmidvektor enthalten, weisen kein entsprechendes Protein auf.

**Beispiel 2: Aufreinigung des rekombinanten trimeren Gliadin analogen Fusionspeptids GAF(3X) durch Affinitätschromatographie**

Bei der Affinitätssäule handelt es sich um eine NiNTA-  
5 Spinsäule (Qiagen), die nach Empfehlungen des Herstellers gehandhabt wird.

Die gemäß Beispiel 1 geernteten Zellen werden erneut wie beschrieben zentrifugiert, in 1 ml „TNI-10-Puffer“ (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert und  
10 durch dreimalige, einminütige Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Stufe 7, MicroTip) aufgeschlossen. Unlösliche Proteine werden durch Zentrifugation bei 21.250 x g für 10 Minuten abgetrennt. 0,5 ml des Überstandes anschließend auf eine mit „TNI-10-Puffer“ äquilibrierte NiNTA-Spinsäule aufgebracht.

15 Nicht- oder schwachbindende Proteine werden durch mehrmaliges Waschen mit 0,5 ml „TNI-10-Puffer“ von der Säule entfernt. Die Elution erfolgt mit 0,2 ml „TNI-150-Puffer“ (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol). Die Elutionsfraktion wird durch Westernblot wie in Beispiel 1 analysiert.

20 Die Eluate enthalten im Wesentlichen ein Protein, das nach Färbung der Westernblotmembran mit Ponceau-S-Färbelösung jeweils einer Bande entsprechend einer Größe von 7,9 kDa entspricht. Nach Westernblot ist eine Bande derselben Größe zu sehen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das exprimierte  
25 Protein nach der Chromatographie im Wesentlichen frei von *E. coli*-Bestandteilen vorliegt.

**Beispiel 3: ELISA zur Bestimmung von Zöliakie- und Dermatitis-herpetiformis-spezifischen Antikörpern.**

Die ELISA-Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc) werden mit in PBS

verdünntem Antigen über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Als besonders bevorzugtes Antigen nutzten wir ein rekombinantes Fusionspolypeptid, zusammengesetzt aus einem immunologisch dominanten, desamidierten Nonapeptid des Gliadins, verknüpft mit einem künstlichen, Gliadin-homologen Oktapeptid ein (gemäß SEQ ID NO 7).

Anschließend werden die mit Antigen beschichteten Platten mit PBS(0,1% Tween 20) gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit PBS-10% fetalem Rinderserum geblockt. Danach werden die Mikrotiterplatten erneut mit PBS-0,1% Tween 20 gewaschen. Die Inkubation der Platten erfolgt wie in den EUROIMMUN-Arbeitsanleitungen beschrieben. Die Ergebnisse zur Leistungsbewertung dieses ELISA sind in Tabellen 2 zusammengestellt.

**Beispiel 4: Immuntherapeutisches Verfahren zur Behandlung der Zöliakie und der Dermatitis herpetiformis.**

Aufgereinigtes Antigen gemäß der Erfindung wird an eine feste Phase gekoppelt und als Immunaффinitätschromatographisches Säulenmaterial eingesetzt. Plasma eines Patienten mit Zöliakie oder Dermatitis herpetiformis wird im Durchfluss über diese Säule geleitet und dem Patienten Antikörper-abgereinigt wieder zugeführt.

**Patentansprüche:**

1. Fusionspolypeptide, die eine Mehrzahl von Peptidsequenzen entsprechend SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 enthalten, wobei bis zu 30 % der Aminosäuren entfernt oder durch einen konservativen Aminosäureaustausch ausgetauscht sein können, wobei die Bindung von Zöliakie- und Dermatitis herpetiformis spezifischen Antikörpern mit der Bindung an das Fusionspolypeptid nach SEQ ID NO: 7 vergleichbar ist.
2. Fusionspolypeptide nach Anspruch 1, die eine Mehrzahl von Peptidsequenzen entsprechend SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3 enthalten.
3. Fusionspolypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Mehrzahl mindestens drei ist.
4. Fusionspolypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, enthaltend eine Mehrzahl von Polypeptiden gemäß SEQ ID NO 4.
5. Fusionspolypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, enthaltend ein oder mehrere Polypeptide gemäß SEQ ID NO 7.
6. Fusionspolypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Form eines Polymers, enthaltend 2 bis 20 Fusionspolypeptide.
7. Fusionspolypeptide gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie rekombinant oder mit herkömmlichen biochemischen Mitteln der Polypeptidsynthese hergestellt werden.
8. Fusionspolypeptide gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem Reportermolekül oder mit einer festen Phase verbunden sind.

9. Verfahren zur Diagnose von Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis, dadurch gekennzeichnet, dass eine flüssige biologische Probe eines Patienten mit einem oder mehreren Fusionspolypeptiden gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Kontakt gebracht wird und die Bindung von Antikörpern aus der biologischen Probe an diese Fusionspolypeptide erfolgen kann, wobei durch den Nachweis dieser Antikörper gegen eines dieser Fusionspolypeptide eine Zöliakie oder Dermatitis herpetiformis diagnostiziert wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Gemisch aus mindestens zwei verschiedenen Polypeptiden gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 verwendet wird.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung der Antikörper mit einem Immunfluoreszenztest, Microarray, ELISA, Lumineszenztest, Blot, Radioimmuntest, Western Blot oder Dot Blot nachgewiesen wird.
12. Testsatz zum Nachweis von Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass er Fusionspolypeptide gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 enthält .
13. Verfahren zur Therapie von Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis, dadurch gekennzeichnet, dass Blut oder Plasma eines Patienten mit Polypeptiden gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 in Kontakt gebracht wird und die Bindung der krankheitsassoziierten Antikörper aus dem Blut oder Plasma an diese Polypeptide erfolgt, wobei das Antikörper-abgereicherte Blut oder Plasma zur Reinfusion an den Patienten geeignet ist.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie Fusionspolypeptide gemäß den Ansprüchen 1 bis 8

enthält.

15. Verwendung eines Fusionspolypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Diagnose oder Therapie von Zöliakie und/oder Dermatitis herpetiformis.

16. Nukleinsäure, welche für ein oder mehrere Fusionspolypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.