

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 463**

21 Número de solicitud: 201001632

51 Int. Cl.:

G01N 33/02 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

28.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.07.2012

Fecha de la concesión:

27.05.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.06.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
OTRI-PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS
DELICIAS S/N
41012 SEVILLA (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**COMINO MONTILLA, Isabel;
REAL CALDERÓN, Ana y
SOUSA MARTÍN, Carolina**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA SELECCIÓN DE SEMILLAS DE CEREALES APTAS PARA SER CONSUMIDAS POR LOS ENFERMOS CELÍACOS.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo para la selección de variedades de semillas de trigo, cebada, centeno, y en particular avena, que manipuladas genéticamente o no, permita que dichas semillas puedan ser usadas en la producción de alimentos y bebidas libres de gluten aptos para los pacientes celíacos, e incluso la elaboración de excipientes de determinados fármacos. Esta invención está basada en un sistema sencillo de detección inmunológica que permite cuantificar los péptidos más inmunogénicos del gluten con el objetivo de saber si la variedad de un cereal, preferentemente avena, puede ser usada para producir semillas aptas que puedan formar parte de la dieta de un celíaco. Los ensayos preferentes usarían al menos un anticuerpo que reconoce la parte más inmunogénica de las prolaminas, y cuya reactividad frente a las semillas del cereal haya demostrado ser proporcional a su inmunogenicidad con células T de enfermos celíacos.

ES 2 385 463 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la selección de semillas de cereales aptas para ser consumidas por los enfermos celíacos

5 **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención tiene por objeto un sistema sencillo de detección inmunológica que permite cuantificar los péptidos más inmunogénicos del gluten con el objetivo de saber si la variedad de un cereal, preferentemente avena, puede ser usada para producir semillas aptas que puedan formar parte de la dieta de un celíaco. Se basa en ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales que detectan el péptido 33-mer de la gliadina y otros péptidos afines tóxicos para los enfermos celíacos.

Se trata de un método específico y fiable que se puede aplicar industrialmente para identificar semillas de avena y otros cereales que sean tolerables y seguras para los pacientes celíacos. Los cereales seleccionados también pueden ser usados para hacer ingredientes que formen parte de excipientes de fármacos, y de otras aplicaciones industriales en productos que van a ser ingeridos por el colectivo celíaco. Por lo tanto, el procedimiento descrito en esta patente puede eventualmente tener un uso no sólo en el sector alimentario sino en el farmacéutico, siendo el sector agrícola el de interés preferente

25 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad celíaca (EC) se define como una alteración de la mucosa del intestino delgado proximal asociada con una intolerancia permanente al gluten, en individuos predispuestos genéticamente a los que se añaden factores ambientales. En esta enfermedad se desarrollan cambios morfológicos de la mucosa del intestino, con largas criptas y atrofas completas o parciales de las vellosidades intestinales después de la ingestión de productos elaborados con

cereales, incluyendo aquellos derivados del trigo, la cebada, el centeno y probablemente la avena.

Las características clínicas de la EC difieren considerablemente en función de la edad de presentación. Los síntomas intestinales y el retraso del crecimiento son comunes en todos aquellos niños que hayan sido diagnosticados dentro de los primeros años de su vida (Stern y col., 2001, Eur J Gastroenterol Hepatol., 13:741-747). El desarrollo de la enfermedad en momentos posteriores de la infancia viene marcado por la aparición de síntomas extraintestinales, como anemia ferropénica refractaria, dispepsia, estreñimiento, dolores óseos y articulares, ataxia, elevación de las enzimas hepáticas, trastornos en la esfera reproductiva, etc. (Stern y col., 2001, Eur J Gastroenterol Hepatol., 13:741-747). La EC está asociada a trastornos autoinmunitarios como la enfermedad de Addison, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, etc. Existen además otras patologías asociadas a la enfermedad celíaca como: síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams y déficit de inmunoglobulina A, enfermedades neurológicas, endocrinas, hepáticas, reumáticas, cardíacas, cutáneas, etc., incluidos tumores malignos de diferente localización, principalmente digestivos.

Originalmente considerado un síndrome raro de malaabsorción infantil, en la actualidad se considera una enfermedad común que afecta aproximadamente al 1% de la población, que puede ser diagnosticada a cualquier edad y que afecta a muchos sistemas orgánicos. Su base genética justifica que puede haber más de un paciente celíaco dentro de una misma familia.

Hasta la fecha, la única terapia efectiva existente es la exclusión completa y permanente del gluten de la dieta, lo que consigue la mejora o desaparición de los síntomas en prácticamente todos los pacientes. Aunque a primera vista llevar una dieta exenta de gluten pueda parecer sencillo, lo cierto es que determinadas situaciones favorecen su ingestión involuntaria, ya que cereales como el trigo están muy arraigados en nuestra sociedad, estando presentes en una gran cantidad de productos manufacturados. Se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de determinar la cantidad máxima de gluten diaria que puede ser consumida por un enfermo celíaco de manera segura. Un estudio sugiere que la ingestión de trazas de gluten por los celíacos debe ser mantenida por debajo de 50 mg al día (Catassi y col., 2007, Am J Clin Nutr., 85:160-166). Sin embargo, y dado que existen distintos niveles de tolerancia a la ingestión de gluten entre los enfermos celíacos, la cantidad de gluten que puede ser ingerida por un enfermo

celíaco no puede ser establecida de manera generalizada, existiendo enfermos celíacos que presentan alteraciones de la mucosa intestinal tras la ingesta de sólo 10 mg de gluten al día (Catassi y col., 2007, Am J Clin Nutr., 85:160-166). Por lo tanto, el mantenimiento de una dieta exenta de gluten no es tarea sencilla, no sólo por el elevado coste económico que implica, sino también porque el gluten está presente en la mayoría de los alimentos que existen hoy día en el mercado. Así por ejemplo, el gluten es un ingrediente común en la dieta humana, quizás, después del azúcar es el ingrediente alimenticio más usado en la civilización Occidental. Por otro lado, hay que resaltar que, según la Comisión del Codex Alimentarius, en la actualidad un alimento "exento de gluten" no es aquel cuyo contenido en gluten es 0, sino el que contiene una cantidad de gluten inferior a 20 mg/kg. Por tanto, a pesar de que un paciente celíaco lleve a cabo una dieta estricta libre de gluten, estaría consumiendo de manera involuntaria pequeñas cantidades del mismo.

El gluten es una mezcla compleja de polipéptidos presente en cereales como el trigo, la cebada, el centeno y la avena. Los principales componentes inmunogénicos del gluten pertenecen a una familia de proteínas caracterizadas por su alto contenido en residuos de prolina y glutamina, conocidas como prolaminas. Las prolaminas del trigo, la cebada, el centeno y la avena, se denominan gliadinas, hordeinas, secalinas y aveninas, respectivamente. La enfermedad se desencadena por la presencia de péptidos procedentes de la fragmentación de las prolaminas, las cuales no son digeridas por las proteasas gastrointestinales y resultan ser tóxicas para los pacientes celíacos. La estructura peptídica es esencial para producir el efecto tóxico, ya que cuando los polipéptidos de las prolaminas se hidrolizan hasta los aminoácidos constituyentes, se pierde la capacidad lesiva para el intestino. Entre los "péptidos tóxicos" identificados el denominado 33-mer, (SEQ ID N° 1, residuos 57-89 de la gliadina) que contiene 6 epítomos de reconocimiento de las células T es uno de los péptidos más inmunogénicos presente en la gliadina y uno de los responsable de la reacción inmune que se desencadena en el intestino de los pacientes celíacos (Shan y col., 2002, Science, 297:2275-2279; Sollid, 2002, Nat Rev Immunol., 2:647-655). Estos autores demostraron mediante estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas y en humanos, que el péptido 33-mer de la α -gliadina es muy resistente a la proteólisis enzimática gástrica pancreática e intestinal. Estos péptidos pasan por la mucosa intestinal donde interaccionan con la transglutaminasa tisular, que transforma los residuos

de glutamina en ácido glutámico y, como consecuencia de ello, se producen una serie de cambios que desencadenan reacciones con base inmunológica, que acaban destruyendo las vellosidades intestinales.

5 Como se ha indicado, actualmente el único tratamiento efectivo para la EC es mantener una dieta estricta exenta de productos elaborados con trigo, cebada, centeno y probablemente la avena. La presencia de este cereal en los alimentos "sin gluten" es controvertida. La avena se diferencia de otros cereales en su contenido en prolaminas, que representa entre un 10-20% del total proteico. Además, las prolaminas de los distintos cereales varían en tamaño molecular y en 10 el contenido aminoacídico. En la avenina, la proporción de prolinas y glutaminas (aminoácidos abundantes en las regiones tóxicas), es menor que en los otros cereales. Algunos investigadores aseguran que los pacientes celíacos toleran la avena sin signos de inflamación intestinal; de hecho en muchos países está permitido el uso de avena en alimentos "sin gluten", por ejemplo Gluten Free 15 Oats®. La reactividad observada con un anticuerpo específico de gliadina en este cereal ha sido atribuida a la contaminación con trigo de alimentos elaborados a base de avena (Hernando y col., 2008, Eur J Gastroenterol Hepatol., 20:545-554). En contraste, existen investigaciones que confirman la toxicidad de la avena en determinados tipos de pacientes celíacos y la imposibilidad de un consumo de 20 avena de manera habitual. Arentz-Hansen y col. (2004, PloS Medic., 1:84-92) describieron el deterioro intestinal sufrido por algunos pacientes tras el consumo de avena y una dieta libre de gluten. Estos pacientes pueden desencadenar una respuesta inmunológica frente a la avenina similar a la producida por el gluten del trigo, centeno o cebada. Un estudio dirigido por el Dr. Knut Lundin (Lundin y col., 25 2003, Gut, 52:1649-1652) con un total de 19 celíacos adultos que estuvieron consumiendo 50 gramos de avena diarios durante doce semanas, demostró que uno de los pacientes celíacos del estudio resultó ser sensible a la avena. La biopsia intestinal mostró una atrofia parcial, que se recuperó considerablemente al dejar de consumir avena, pero de nuevo desarrolló una atrofia subtotal y 30 dermatitis aguda al volver a consumir avena. Esto sugiere la necesidad de distinguir grupos de enfermos celíacos en función de su sensibilidad frente a los cereales e identificar el origen de la inmunogenicidad en los péptidos de las aveninas. Silano y col. (2007, J Gastroenterol Hepatol., 22:528-531; 2007, Scand J Gastroenterol., 42:1302-1305) realizaron una serie de ensayos *in vitro* con 35 distintas variedades de avena, aplicando diversas técnicas inmunológicas

incluyendo la activación de linfocitos periféricos de pacientes celíacos, y comprobaron que todas las variedades objeto de estudio eran tóxicas para los enfermos celíacos pero existían diferencias en los niveles de toxicidad. Por lo tanto, es crítico aclarar cualitativamente y/o cuantitativamente el potencial inmunotóxico de la avena para los pacientes celíacos por las evidentes consecuencias clínicas.

Otros autores (Spaenij–Dekking y col., 2005, *Gastroenterology*, 129:797-806) han sugerido que hay variaciones en la toxicidad de las distintas variedades de trigo, indicando la posible selección de variedades no tóxicas para enfermos celíacos mediante secuenciación de las prolaminas, reactividad de células T y el uso de algunos anticuerpos específicos de distintas subunidades de las gliadinas y gluteninas. En este trabajo no se propone un método fiable práctico que reproduzca en todos los casos los resultados obtenidos mediante reactividad con células T, necesitando incluso el uso de múltiples anticuerpos para tener datos concluyentes, lo cual lo hace poco práctico para aplicarlo en industria y complica las conclusiones que pueden obtenerse por el diferencial en potencial inmunotóxico de cada péptido detectado.

Por otro lado, otros autores están trabajando en la obtención de semillas de trigo con cantidades de gliadinas reducidas usando técnicas de supresión génica (Gil-Humanes y col., 2010, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:17023-17028). Se necesitarán técnicas prácticas que permitan seleccionar e incluso cuantificar la potencial toxicidad de las semillas de las distintas líneas de cereales seleccionados.

Medir la potencial toxicidad para celíacos de variedades de semillas mediante ensayos con células T aisladas de pacientes celíacos, es una técnica inviable para realizarla de manera rutinaria en la industria ya que requiere trabajar con sangre periférica de un número determinado de pacientes celíacos, personal muy especializado, reactivos muy caros y la conservación óptima de estas células inmunológicas. Por otra parte, se necesita que los experimentos a realizar sean aprobados por el Comité Ético del Hospital donde se realiza la toma de muestra. Con estos antecedentes, lo ideal sería tener un ensayo inmunológico *in vitro* que refleje lo más posible la información que se puede obtener tras realizar los experimentos de reactividad con células T aisladas de individuos celíacos, y compararla con la reactividad de anticuerpos obtenidos frente a algún epítipo inmunotóxico predominante en el gluten presente en las semillas. Estos epítipos

reconocidos tendrían que estar ausente en cereales seguros como el maíz o el arroz, y tener su análogo en los cereales inmunotóxicos (trigo, cebada, centeno), y presentar análogos menos reactivos en avenas, reflejando la potencial inmunotoxicidad de cada variedad. En trabajos previos, se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales (moAbs), G12 y A1, frente al péptido 33-mer de la gliadina (Morón y col., 2008, *Am J Clin Nutr.*, 87:405-414). Los resultados obtenidos mostraron que la reactividad de cada moAb se correlacionaba con el potencial inmunotóxico de los cereales alimenticios a partir de los que se extrajeron las proteínas. Los ensayos inmunológicos realizados con estos anticuerpos demostraron que son los únicos descritos en el mercado capaces de reconocer con una alta especificidad el péptido 33-mer (Morón y col., 2008, *Am J Clin Nutr.*, 87:405-414; 2008, *PloS One*, 3:e2294; Cebolia y col., 2009. 13th International Coeliac Disease Symposium, Amsterdeam, The Netherlands). El péptido 33-mer se caracteriza porque contiene 6 epítomos de reconocimiento de las células T, uno de los péptidos más inmunogénicos presente en la gliadina y uno de los responsables de la reacción inmune que se desencadena en el intestino de los pacientes celíacos. Los ensayos inmunológicos realizados con el anticuerpo G12 demostraron que es el único, junto con el moAb A1, descrito en el mercado capaz de reconocer con una alta especificidad el péptido 33-mer (Morón y col., 2008, *Am J Clin Nutr.*, 87:405-414; 2008, *PloS One*, 3:e2294). Los estudios con células T indicaron que la activación de éstas por gluten digerido con glutenasas (enzimas que digieren péptidos del gluten) disminuyó de manera equivalente a la detección de péptidos tóxicos con los anticuerpos (Morón y col., 2008, *PloS One*, 3:e2294; Ehren y col., 2009, *PloS One*, 4:e6313). Además, los sistemas inmunológicos descritos son capaces de detectar otros péptidos inmunogénicos que intervienen en la inmunidad innata y adaptativa de la enfermedad celíaca.

Los estudios con células T indicaron que la activación de éstas por gluten digerido con glutenasas (enzimas que digieren péptidos del gluten) disminuyó de manera equivalente a la detección de péptidos tóxicos con los anticuerpos (Morón y col., 2008, *PloS One*, 3:e2294; Ehren y col., 2009, *PloS One*, 4:e6313). Este ensayo permite evitar los falsos positivos y negativos que se obtienen cuando se utiliza un método de análisis que no tiene en cuenta la toxicidad real del gluten.

En estos trabajos previos, los anticuerpos anti-33-mer de gliadina, A1 y G12, mostraron reactividad frente a cantidades de avena relativamente más altas

que la gliadina de trigo. La reactividad fue claramente por encima del control negativo aunque su detección era menos sensible (Morón y col., 2008, PloS One, 3:e2294).

5 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención describe un método que se puede aplicar industrialmente para identificar semillas de avena y otros cereales que sean tolerables y seguras para el colectivo celíaco. Se basa en ensayos inmunológicos sencillos mediados por uno o varios anticuerpos monoclonales que detectan el péptido 33-mer y otros péptidos afines tóxicos para los enfermos celíacos. El método descrito es capaz de detectar epítomos que tienen similitud suficiente en la avena a los descritos previamente como más inmunotóxicos en trigo, y que son detectables en algunas variedades de avena y en otras no. La intensidad de la señal obtenida con el anticuerpo anti-33-mer es proporcional al daño potencial causado en individuos celíacos, medido mediante proliferación celular y producción de interferón-gamma (INF- γ) por células T de estos pacientes. El método descrito en la presente invención es específico y fiable para detectar variedades de avena potencialmente seguras para los pacientes celíacos.

Las semillas que no dieran reactividad con el anticuerpo anti-gliadina 33-mer serían seguras para ser consumidas por el colectivo celíaco, se podrían cultivar y vender certificadas por su inocuidad en su consumo por el colectivo celíaco, ya que el único tratamiento efectivo hasta la fecha para esta enfermedad es una dieta libre de gluten. Estos métodos inmunológicos serían preferiblemente ELISAs, pero también contemplan tiras inmunocromatograficas, micropartículas fluorescentes marcadas recubiertas por anticuerpos (por ejemplo, la tecnología Xmap de Luminex), Western blots, biosensores con detección por anticuerpos. Dichos métodos están constituidos por uno o varios anticuerpos monoclonales con capacidad para identificar y cuantificar los epítomos más inmunogénicos del gluten. El anticuerpo preferente para su uso en la selección de semillas sería el anticuerpo anti-gliadina G12, que presenta el epítomo de reconocimiento SEQ ID N° 2 dentro del 33-mer, descrito por Morón y col. (2008, PloS One, 3:e2294). Así mismo podría servir el anticuerpo monoclonal A1 (epítomo de reconocimiento SEQ ID N° 3 dentro del 33-mer), descrito por los mismos autores, obtenido también por inmunización con el 33-mer, e incluso el R5, que aunque de 100 a 60.000 veces

menos sensible para detectar el 33-mer que A1 y G12, detecta otros péptidos similares al 33-mer.

5 Una forma preferente de la invención sería realizar un ensayo inmunológico tipo ELISA competitivo caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es el moAb G12 y estaría conjugado a un enzima típicamente usada en estos métodos como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa. Se podría usar en el ensayo un patrón de gliadina, gliadina hidrolizada o péptido 33-mer.

10 La validez del concepto se manifestaría por la relación de proporcionalidad entre la señal obtenida mediante la reactividad con el anticuerpo monoclonal anti-gliadin 33-mer, preferiblemente G12, y el daño potencial causado por las proteínas tóxicas en los individuos celíacos medido mediante proliferación celular y producción de INF- γ por células T de pacientes con EC.

15 Otro objeto de la invención lo constituye la aplicación de un ELISA competitivo, un ELISA Sandwich o un Western blot con el anticuerpo G12 caracterizados por su capacidad para detectar prolaminas de trigo, cebada, centeno y, según su potencial inmunogénico, prolaminas de avena.

20 Este procedimiento se caracteriza por su capacidad para identificar y cuantificar los péptidos más inmunogénicos del gluten en distintas variedades de un cereal. Así como también para la selección de cereales empleados en la elaboración de ingredientes que formen parte de excipientes de fármacos, y de otras aplicaciones industriales en productos que van a ser ingeridos por el colectivo celíaco.

25 Mediante los estudios de reactividad con anticuerpos anti-33-mer frente a las diferentes variedades y su correlación en los ensayos biológicos con células T, quedaría demostrado que existe una gran variabilidad en el potencial inmunotóxico de los diferentes cultivares de avena.

30 Dado que las células T o ensayos biológicos similares no son utilizados normalmente como técnicas rutinarias para evaluar el riesgo de los alimentos en controles de seguridad alimentaria, técnicas inmunoquímicas basadas en anticuerpos que reflejen dicha toxicidad de forma reproducible, son métodos convenientes para evaluar la inmunotoxicidad potencial que un determinado cereal pueda tener para el colectivo celíaco.

Con esta invención se dispone de un camino racional hacia la selección de

variedades de cereales, y en particular de la avena, que podrían ser seguras para una dieta exenta de gluten, lo que permitiría la incorporación de este cereal en la dieta diaria de los enfermos celíacos aportándole un gran beneficio a este colectivo, ya que en los últimos años el interés sobre la avena para consumo humano ha aumentado debido al reconocimiento de su valor nutricional y sus beneficios para la salud. Los granos de avena contienen altas cantidades de nutrientes como fibras solubles, proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas, minerales y fitoquímicos. La incorporación de algunas variedades de avena y otros cereales que se determinasen seguros por este método, podrían ser introducidos en la dieta sin gluten de los celíacos lo que permitiría mejorar la calidad de la nutrición del colectivo celíaco y utilizarlos en las dietas de determinadas enfermedades. Es también objeto de la presente invención, la selección de otros cereales por el mismo método inmunológico, que puedan tener alta variabilidad en el contenido de péptidos inmunotóxicos, como semillas de trigo y otros cereales manipulados genéticamente con el fin de suprimir los péptidos inmunotóxicos. Dicha selección previa de semillas podría ser posteriormente verificada por ensayos inmunológicos en células de enfermos celíacos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, con carácter ilustrativo y no limitativo, las figuras siguientes:

Figura 1. Evaluación de la presencia de ADN amplificable en variedades de avena, así como en trigo y arroz mediante PCR. Gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de dos muestras representativas de avena, trigo y arroz. M: marcador de peso molecular de ADN (200 pb). Control positivo: ADN de los cereales amplificado con los primers 18S. Los primers usados fueron: a. 18S, b. ω -avenina (avena), c. ω -hordeína (cebada), d. ω -secalina (centeno) y e. ω -gliadina (trigo).

Figura 2. Comparación de las fracciones de aveninas extraídas a partir de distintas variedades de avena. Espectros de las aveninas de 9

variedades diferentes obtenidos mediante MALDI-TOF MS. Análisis del extracto proteico de las diferentes variedades mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. M: Marcador de peso molecular proteico.

5 **Figura 3.** Afinidad relativa del anticuerpo monoclonal G12 frente a distintas variedades de avena. A. ELISA competitivo utilizando el anticuerpo G12-HRP para determinar la reactividad de este anticuerpo frente a distintas variedades de avena. Se realizaron tres ensayos con tres replicas cada uno. Como control positivo se utilizó gliadina. B. IC50 y RC de las distintas variedades de avena. N.A.: No aplicable. C. Western blot de las fracciones tóxicas de las
10 prolaminas extraídas de los granos de avena. La membrana fue revelada con el anticuerpo G12. El código de colores utilizado fue el mismo que en A y B. M: Marcador de peso molecular proteico.

Figura 4. Detección de la concentración del péptido 33-mer en diferentes variedades de avena. La concentración de 33-mer se determinó
15 mediante ELISA competitivo utilizando el anticuerpo G12-HRP. Se realizaron tres ensayos con tres replicas cada uno. Porcentaje de 33-mer de la variedad ensayada respecto a la variedad más reactiva, OM719. * Concentración de 33-mer inferior al límite de cuantificación del ensayo (5,4 ng/mL). N.A.: No aplicable.

Figura 5. Respuesta proliferativa de las células T de pacientes celíacos frente a péptidos desaminados de las prolaminas de tres variedades de
20 avena. Las PBMCs fueron expuestas durante 48 h a prolaminas digeridas y tratadas con transglutaminasa tisular. Los valores se expresan como unidades de D.O. a 450 nm. Gliadina y orzenina se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Se representa la media \pm SEM de dos ensayos en dos días
25 distintos. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la orzenina ($p < 0,05$).

Figura 6. Producción de INF- γ por las células T de pacientes EC expuestas a prolaminas digeridas y desaminadas de tres variedades de avena. La
30 producción de INF- γ fue evaluada mediante ELISA tras 48 horas de incubación. Gliadina y orzenina se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Se representa la media \pm SEM de dos ensayos en dos días distintos. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la orzenina ($p < 0,05$).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**Ejemplo 1. Determinación de la pureza de las distintas muestras de avena**

5 En el presente ejemplo, se muestra la importancia de verificar la pureza de las semillas de avena que se van a analizar antes de determinar su potencial inmunotóxico, ya que cualquier contaminación de otros cereales (cebada, trigo etc) darían falsos positivos. Trabajos previos han propuesto que la toxicidad de los alimentos elaborados a base de avena es debida a la contaminación de los
10 mismos con otros cereales tóxicos para los enfermos celíacos (trigo, cebada y centeno). Un ejemplo de ello, es el trabajo publicado por Hernando y col. (2008, Eur J Gastroenterol Hepatol., 20:545-554) en el que se establece que la reactividad del anticuerpo R5 frente a determinados alimentos elaborados con
15 avena se debe a la contaminación de este cereal con trigo, cebada o centeno (Pulido y col., 2009, Adv Food Nutr Res., 57:235-285). Para este estudio la pureza de las muestras de las distintas variedades de avena fue controlada de dos formas, la primera de ellas realizando un examen visual de forma individualizada de los granos de avena para evitar la presencia de granos de otros cereales. La segunda forma de control fue utilizando la reacción en cadena de la polimerasa
20 (PCR) ya que es un método altamente específico y sensible para la detección de pequeñas cantidades de ácido nucleico. En los estudios de calidad alimentaria, la PCR ha sido aplicada en la detección de organismos modificados genéticamente, hongos patógenos, microorganismos y virus, así como para la identificación de especies animales en productos cárnicos o para la detección y discriminación de
25 la contaminación de alimentos exentos de gluten con cereales. En general, la presencia de proteínas de cereales está relacionada con la presencia de ADN, en este estudio se ha usado la tecnología de la PCR para la detección de ácido nucleico de diversos cereales (trigo, centeno y cebada) en las muestras de avena.

30 Para detectar la contaminación de cereales (trigo, centeno y cebada) en las diferentes variedades de avena, se eligieron para la amplificación determinadas secuencias diana específicas de fragmentos codificantes de gliadina (trigo), secalina (centeno), hordeína (cebada) y avenina (avena). La secuencia nucleotídica de estos genes de proteínas de almacenamiento de cereales está bien caracterizada y secuenciada, mostrando un elevado grado de homología

entre las secuencias de los genes de las prolaminas del trigo, de la cebada y del centeno. Sin embargo, fue posible diseñar parejas de primers que podían discriminar entre los distintos cereales. Los primers utilizados para la amplificación de los genes ω -gliadina, ω -secalina, ω -hordeína y ω -avenina, fueron diseñados con el software PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Los primers específicos forward y reverse respectivamente, fueron: 5'- TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA-3' y 5'- AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' para el gen 18S ribosómico, 5'- CAGAAAGCGAGTGGAAAGATGAAAG-3' y 5'- GCAAGGAGGACAAAGATGAGGGAA-3' para el gen ω -gliadina (longitud del fragmento amplificado de 181 pb), 5'- TTTTTCAGAAAGCGAGTTCAATGATG-3' y 5'- CGAGGACAAAGATGAGGAAGGTCT-3' para el gen ω -secalina (longitud del fragmento amplificado de 181 pb), 5'- ATTAATTCCCAAACCTGAACGACTA-3' y 5'- CATGGCGAACAATGTGAAC-3' para el gen ω -hordeína (fragmento amplificado de 164 pb), 5'-CGCTCAGTGGCTTCTAAGA-3' y 5'- TTTTATTTTATTTGTACCGCTAC-3' para el gen ω -avenina (fragmento amplificado de 104 pb). Los oligonucleótidos utilizados fueron proporcionados por Biomedal S.L. (Sevilla, España).

Usamos el sistema de PCR para la amplificación de los genes de las prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena. Para ello, se utilizaron semillas de avena (*Avena sativa*) de distintas variedades: OM719, OE717, OL715, OA729, OH727, OC723, OF720, OR721 y OP722, suministradas por diferentes fuentes comerciales españolas y australianas. Se usaron semillas de trigo (*Triticum durum*, variedad Don Pedro, C.S.I.C., Córdoba, España) y arroz (*Oryza sativa* subespecie Japónica, variedad J. Sendra, Federación de Arroceros, Sevilla, España) como control positivo y negativo, respectivamente.

Los granos de los distintos cereales fueron triturados en un molinillo eléctrico para obtener muestras homogéneas. La extracción del ácido nucleico se realizó usando el método del CTAB modificado. Cada muestra fue congelada con nitrógeno líquido y transferida a un tubo de 2 mL que contenía 1 mL de tampón de extracción [Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM (pH 8,0), CTAB 2% (w/v) y 2-mercapto-etanol (14,3 N)]. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 65°C durante 30 minutos agitándolas cada cierto tiempo. Tras la incubación, se añadió 500 μ L de cloroformo y las muestras se centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 2

mL, al que se añadió 0,8 volúmenes de isopropanol para la precipitación del ADN. Los lavados fueron realizados con etanol al 70% (v/v). Finalmente, el ADN fue eluido en 60 mL de tampón Tris-HCl 10 mmol/L (pH 8,0) que contenía 20 μ L/mL de RNasa (solución RNasa A, Promega). Las concentraciones de ADN fueron determinadas por absorción de UV a 260 nm y la pureza de la solución de ADN fue evaluada por la proporción de absorción 260/280 nm.

La premezcla de PCR (Laboratorios Biotools B&M, Madrid, España) fue utilizada con 1 pmol de cada primer y 50 ng del DNA molde. La reacción de amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones: ciclo 1, 95°C durante 3 min; ciclo 2, 95°C durante 30 s, 52°C durante 30 s y 72°C durante 30 s (repetiendo las mismas condiciones durante 35 ciclos); ciclo 3, 72°C durante 5 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de electroforesis al 2% (w/v) de agarosa MS (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

De esta forma se determinó que la longitud del fragmento amplificado varió en los distintos cereales, desde 104 bp para la avena, 164 bp para la cebada hasta 181 bp para el trigo y el centeno. En estos experimentos, se obtuvieron resultados negativos en las muestras de avena para PCR específica de trigo, centeno y cebada; sin embargo, se obtuvieron resultados positivos al amplificar las muestras de avena con los primers específico 18S. La amplificación de trigo mostró resultados positivos en la PCR específica para el 18S y la gliadina. El análisis en gel de agarosa de los productos de ADN amplificados mediante PCR confirmó que todas las muestras de avena estaban exentas de contaminación con trigo, cebada, centeno o mezcla de estos cereales (Figura 1).

Ejemplo 2: Análisis de la variabilidad de las aveninas de los cultivares de avena

En el presente ejemplo de aplicación se muestra como hay una gran variabilidad de las aveninas de distintos cultivares de avena, lo que en principio también es indicativo de una potencial diversidad en la inmunotoxicidad potencial. La tecnología MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) se utiliza actualmente para la identificación de un gran número de subunidades de gliadinas y gluteninas en el trigo y otros cereales (Qian y col., 2008, J Am Mass Spectrom., 19:1542-1550). En este estudio hemos usado dicha técnica junto con SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para analizar el contenido en prolaminas de la avena y

encontrar rasgos moleculares que permitan identificar y caracterizar las distintas variedades. Para ello, las muestras de harinas (6 g) de las distintas variedades de avena se obtuvieron mediante trituración de las semillas, se resuspendieron en etanol al 70% (v/v) (30 mL) y se mantuvieron durante 24 horas en agitación. Posteriormente, la mezcla fue filtrada y las prolaminas fueron precipitadas mediante adición de etanol absoluto hasta conseguir una concentración final del 93%. Las prolaminas fueron obtenidas tras incubación de las muestras a 4°C durante 16h. Trascurrido este tiempo se centrifugó a 8.000 g durante 10 minutos y se recogió el precipitado que contenía las proteínas objeto de estudio. La concentración proteica fue medida por el método de Bradford (Bradford, 1976, Anal Biochem., 72:248-254).

Para el análisis mediante MALDI-TOF MS a las extracciones de las aveninas (5 μ L) se les añadió 2 μ L de detergente octyl- β -D-glucopiranosido, y como solución matriz se usó 25 μ L de ácido sinapínico saturado en acetonitrilo al 30% (v/v) que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). La mezcla matriz-muestra fue secada durante 15 min en una centrifuga speed-vac y posteriormente resuspendida en 6 μ L de etanol al 60% con ácido trifluoroacético al 0,1%. 2 μ L de la mezcla fueron depositados en una sonda de acero inoxidable y secados durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se midieron en el sistema PE Biosystems MALDI-TOF Voyager DE-PRO con una configuración estándar. El espectro de masas fue registrado en un modo linear positivo con un voltaje de aceleración de 25 kV y el espectro final se obtuvo por acumulación de 200 espectros de disparo de laser único bajo irradiación umbral. El equipo se calibró externamente usando señales de carga simple y doble de BSA con masas moleculares de 66.430 y 33.215 Da respectivamente. La identificación de aveninas por MALDI-TOF MS mostró perfiles de masas protonadas característicos (Camafeita y col., 1977, J Mass Spectrom., 32:444-449).

Para el análisis mediante SDS-PAGE, las prolaminas anteriormente extraídas fueron diluidas en tampón de electroforesis (62.5 mM Tris-HCl a pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 0,001% azul de bromofenol y 5% 2-mercapto-etanol) y desnaturalizadas mediante ebullición a 100°C durante 5 min. Este paso se repitió un total de tres veces. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12,5% a un voltaje constante de 100 V utilizando el sistema MiniProtein (BioRad Laboratories). Las proteínas separadas en el gel de electroforesis, fueron teñidas usando tinción de plata.

El espectro obtenido por MALDI-TOF MS de las fracciones de aveninas de las diferentes variedades de avena, así como la distribución electroforética de las prolaminas observadas mediante SDS-PAGE, revelaron que las distintas variedades presentaban perfiles proteicos diferentes, lo que podría permitir una
5 identificación más exhaustiva (Figura 2). Tanto en el espectro obtenido mediante MALDI-TOF como en el SDS-PAGE, en todos los casos, la distribución de pesos moleculares se localizó entre 19 y 31 kDa, lo que concuerda con lo descrito hasta la fecha por otros autores (Chesnut y col., 1989, *The Plant Cell*, 1:913-924; Hernando y col., 2008, *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 20:545-554). El número y la
10 intensidad relativa de los picos obtenidos por MALDI-TOF en los 9 cultivares fue muy variable, lo que indica que existen diferencias entre las aveninas extraídas de los distintos cultivares. La variabilidad en cuanto al tamaño y distribución proteica también fue evidente en los geles SDS, las bandas obtenidas difieren tanto en la movilidad electroforética como en intensidad. Estos resultados indican la
15 presencia de distintas subunidades de prolaminas en las 9 variedades de avena que difieren tanto en su composición aminoacídica como en su tamaño.

Ejemplo 3: Reactividad diferencial de un anticuerpo anti-gliadina 33-mer frente a distintas variedades de avena

20 En el presente ejemplo se muestra cómo un anticuerpo que reconoce el péptido 33-mer de gliadina, puede tener una gran variabilidad de reactividad con las distintas variedades de avena. En el ejemplo se muestra como el moAb G12 que era capaz de detectar epítomos relacionados con el péptido 33-mer en prolaminas de varios cereales, reacciona de forma distinta con distintas
25 variedades de avena siendo su reactividad nula en algunas de dichas variedades. Los resultados indican que el moAb anti-33-mer muestra reactividad frente a prolaminas de trigo, cebada y centeno, cereales tóxicos para los pacientes celíacos. Este anticuerpo también fue capaz de detectar aveninas presentes en la avena, aunque la sensibilidad obtenida en este caso fue menor, lo que puede ser
30 debido en parte, a la menor proporción de estas prolaminas con respecto al contenido proteico total de este cereal en relación a la proporción de gliadinas, hordeínas o secalinas en sus respectivos granos, y principalmente a la menor afinidad de este anticuerpo frente a epítomos de las aveninas. El anticuerpo G12 no reaccionó con las prolaminas extraídas de arroz (orzenina) y maíz (zeína),
35 cereales no tóxicos para pacientes celíacos. La reducción de la sensibilidad del

anticuerpo G12 hacia las prolaminas de la avena podría ser debido a una menor prevalencia de los epítomos de reconocimiento de este anticuerpo en las aveninas, con respecto a las gliadinas, hordeínas y secalinas.

5 Para determinar si el moAb G12 presentaba distinta reactividad frente a diferentes variedades de avenas, la afinidad del anticuerpo fue determinada mediante ELISA competitivo. Para este ensayo se usó placas Maxisorp microtiter (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que fueron recubiertas con 100 μ L/pocillo de solución de gliadina Sigma (5 μ g/mL) en 0,1 M de PBS (Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH 9,6), e incubadas a 4°C toda la noche. Las placas fueron lavadas con PBS 0,05% 10 Tween® 20 y bloqueadas con solución de bloqueo (PBS, 5% leche desnatada) durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones seriadas de la gliadina y de las muestras de estudio en PBS con BSA 3% (100 μ L) y a cada una de ellas se añadió 100 μ L de solución de moAb G12 conjugado con HRP (peroxidasa) (1:10.000 en PBS con BSA 3%). Se preincubaron las muestras 1 h a temperatura 15 ambiente con agitación suave, y posteriormente se añadieron en los pocillos. Tras 30 minutos de incubación, se lavaron las muestras, y se les añadió 100 μ L/pocillo de solución de sustrato (TMB, Sigma, St Louis, Missouri, EE. UU.). Trascurridos 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en oscuridad, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 1 M (100 μ L/pocillo), y la absorbancia se midió a 450 20 nm (Lector de microplacas UVM340, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

Los resultados obtenidos mostraron que las distintas variedades de avena presentaban diferente reactividad hacia al anticuerpo G12 (Figura 3A). En función de la afinidad del anticuerpo frente a las distintas variedades de avena se 25 pudieron distinguir claramente tres grupos: un grupo con elevada afinidad hacia el anticuerpo (variedades OM719, OA729 y OE717), un grupo de reconocimiento intermedio (variedades OH727, OL715 y OC723) y otro que no fue reconocido por el moAb G12 (variedades OF720, OR721 y OP722). Resultados similares a los descritos fueron obtenidos con el anticuerpo A1 (Morón y col., 2008, PloS One, 3:e2294).

30 Con el fin de cuantificar la afinidad del anticuerpo G12 por las diferentes variedades de avena, se determinó la concentración de antígeno con la que se obtenía una reducción del 50% de la señal máxima (IC50) y la reactividad cruzada (RC) de cada una de ellas (Figura 3B). La RC se determina como (IC50 de la variedad de avena que presenta la mayor afinidad por el anticuerpo/IC50 de cada 35 variedad ensayada) x 100. Las variedades OE717 y OA729 mostraron una RC

entorno al 60 y 75% respectivamente, en relación a la variedad más sensible (OM719). Así mismo, OH727, OL715 y OC723 con una RC de 25, 24 y 12 % respectivamente, son reconocidas por el anticuerpo G12 pero con una menor sensibilidad. Al igual que el control negativo (arroz), las aveninas de las variedades OF720, OR721 y OP722 no fueron reconocidas por el anticuerpo. Los resultados obtenidos parecen indicar que las variedades OF720, OR721 y OP722 de avena podrían ser potencialmente seguras para ser utilizadas en una dieta exenta de gluten en los pacientes celíacos.

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en el ELISA competitivo mediante otra técnica inmunológica e identificar el perfil proteico reactivo para el anticuerpo anti-33-mer, se llevó a cabo un análisis mediante inmunoblotting usando el moAb G12. Los extractos proteicos obtenidos inicialmente fueron separados mediante gel SDS-PAGE y seguidamente incubados con el anticuerpo G12 en membranas de PVDF. Posteriormente, se incubaron en tampón de bloqueo (TBS con leche desnatada al 5%) durante toda la noche, tras lo cual se añadió el anticuerpo G12 (dilución 1:5000 en solución de bloqueo). Después de 3 lavados, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado a fosfatasa (Sigma, Sr. Louis, MO) (dilución 1:2000 en solución de bloqueo). La membrana se reveló utilizando el sistema Sigma-Fast. Los resultados obtenidos mediante Western blot (Figura 3C) muestran que el moAb G12 presenta afinidad por las variedades OM719, OA729, OE717, OH727, OL715 y OC723. Sin embargo, dicho anticuerpo no reaccionó con OF720, OP722 y OR721. De esta forma, la variabilidad en la reactividad observada en el Western blot confirma los resultados previamente obtenidos en el ELISA competitivo, así mismo, se observó que los perfiles proteicos obtenidos en las variedades reactivas difieren unas de otras. Las variedades OM719 y OE717, presentaron fracciones proteicas reactivas similares, sin embargo, OA729, OC723, OH727 y OL715 presentaron perfiles proteicos cuyas bandas se diferenciaban en peso molecular e intensidad. Estos resultados sugieren la presencia de distintas subunidades de prolaminas en las variedades de avena, que difieren entre sí en cuanto a composición en aminoácidos y tamaño. Así mismo, las diferencias en la reactividad con el anticuerpo monoclonal G12 parecen indicar variaciones en la secuencia proteica de los epítomos de reconocimiento del anticuerpo presentes en las aveninas de las distintas variedades de avenas.

Ejemplo 4: Determinación de la cantidad efectiva de péptidos inmunoreactivos en la avena

5 En el presente ejemplo se muestra cómo se puede determinar la concentración equivalente de péptido 33-mer en semillas usando un anticuerpo anti-33-mer de gliadina con un péptido con dicha secuencia como referencia. El péptido 33-mer ha sido definido como uno de los principales contribuyentes de la inmunotoxicidad del gluten (Shan y col., 2002, Science, 297:2275-2279). Este péptido de la α -2 gliadina contiene 6 epítomos de reconocimiento para las células T y es muy resistente a la proteólisis. El anticuerpo monoclonal G12 es específico para el epítomo de 6 aminoácidos SEQ ID N° 2, que aparece 3 veces a lo largo de la secuencia peptídica del 33-mer. Este anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer otros péptidos inmunoreactivos presentes en la gliadina y en otras prolaminas tóxicas (Morón y col., 2008, PloS One, 3:e2294; Ehren y col., 2009, PloSOne, 4:e6313).

10 Con el fin de determinar la cantidad relativa de epítomos inmunotóxicos presentes en las prolaminas de las diferentes variedades de avena, elegimos de cada grupo identificado anteriormente una variedad. Para el grupo de mayor afinidad por el anticuerpo elegimos OM719, para el de reactividad intermedia, escogimos la variedad OH727, y OF720 del grupo de variedades que el anticuerpo G12 no reconoció. La presencia de péptidos inmunoreactivos fue determinada por ELISA competitivo G12, utilizando como patrón el péptido 33-mer. El ensayo se llevo a cabo usando el mismo protocolo de ELISA descrito anteriormente, pero en este caso se utilizó el péptido 33-mer como curva estándar para medir la concentración de epítomos tóxicos presentes en las muestras de estudio. La concentración de 33-mer en cada una de las muestras se determinó mediante el cálculo de la ecuación que definió la recta patrón y posterior extrapolación a partir de los datos de absorbancia obtenidos en cada muestra.

25 La presencia equivalente de 33-mer en la variedad más reactiva, OM719, fue del orden de 1,340 ng por mg de avenina (Figura 4). En la variedad OH727, los niveles de 33-mer se vieron disminuidos del orden de 4 veces con respecto a los de OM719. Sin embargo, en el caso de OF720, la concentración de péptido 33-mer se redujo más de 1300 veces en relación a OM719, llegando a niveles indetectables por nuestro método. Estos resultados confirman los datos obtenidos previamente mediante IC50 y reactividad cruzada, así como por Western blot.

Igualmente, estos resultados indican la gran diferencia que existe entre unas variedades y otras en cuanto a la presencia de secuencias inmunotóxicas para el paciente celíaco, y la posibilidad de encontrar semillas de avena sin cantidades equivalentes de 33mer detectables.

5

Ejemplo 5: Correlación entre la reactividad del anticuerpo G12 y la inmunogenicidad de las diferentes variedades de avena

En el presente ejemplo se muestra como las variaciones de la reactividad del anticuerpo anti-33-mer observadas para las diferentes variedades de avena se correlacionan con la mayor o menor inmunogenicidad del cereal. La inmunogenicidad fue determinada mediante ensayos de proliferación de células T y producción de INF- γ . La capacidad de las aveninas de inducir una respuesta inmune fue analizada usando linfocitos periféricos de individuos celíacos, utilizando como control positivo gliadina de trigo y como negativo prolaminas de arroz. Para realizar este ejemplo se seleccionó tres cultivares de avena, uno de cada grupo identificado previamente, así la variedad OM719 representaba al grupo que mostró mayor afinidad hacia el anticuerpo G12, OH727 al de reactividad intermedia, y OF720 al grupo que no fue reconocido con el anticuerpo. Se evaluó si existía una correlación entre el potencial inmunotóxico de las distintas variedades de avena y su reactividad frente al anticuerpo G12. Para ello se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

5.1. Digestión con pepsina, tripsina y quimotripsina La fracción proteica soluble en etanol fue extraída de la harina y sometida a digestión secuencial con pepsina, tripsina y quimotripsina (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Se simuló la digestión gastrointestinal de manera que se incubaron las muestras de prolaminas con 0,6 mg/mL de pepsina en HCl 0,2 M durante 1 h a 37°C con agitación suave. Trascorrido dicho tiempo, se modificó el pH de las muestras con Na₂HPO₄ hasta alcanzar un pH entorno a 6-7, tras lo cual se añadieron las enzimas tripsina y quimotripsina con una concentración de 0,375 mg/mL. Las muestras se incubaron nuevamente durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Para la inactivación de las enzimas, las muestras sufrieron tratamiento térmico (100°C durante al menos 5 min). Las prolaminas digeridas fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso.

5.2. Desaminación de las muestras con transglutaminasa tisular: la desaminación específica de los péptidos de las prolaminas por la transglutaminasa

35

tisular, es habitualmente necesario para la unión a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (DQ2/DQ8) de las células presentadoras de antígeno y el posterior reconocimiento por las células T. Por ello, los péptidos de las aveninas de las diferentes variedades de avena, así como los controles de gliadina y orzenina, fueron tratados, durante 4 h a 37°C, con 100 g/mL de transglutaminasa tisular (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) en presencia de CaCl₂ 2 mM.

5.3. Pacientes: Este estudio se realizó tras la aprobación del Comité Ético del "Hospital Virgen de las Nieves". Las biopsias de intestino delgado fueron obtenidas por endoscopia gastrointestinal bajo consentimiento de los pacientes para utilizarlas en investigaciones sobre la enfermedad celíaca (los pacientes fueron monitorizados en el "Hospital Virgen de las Nieves" de Granada, España). Los pacientes con enfermedad celíaca presentaban atrofia parcial o total de las vellosidades con aumento en los linfocitos intraepiteliales. Los casos de histología positiva se clasificaron de acuerdo al criterio Marsh (tipos I-IV) (Marsh y Crowe, 1995, Baillieres Clin Gastroenterol., 9:273-293).

El diagnóstico de los pacientes con enfermedad celíaca se realizó mediante test serológico acompañado de biopsia intestinal y confirmación de una respuesta clínica a la supresión del gluten de la dieta. Se analizaron anticuerpos antiendomiso, anticuerpos anti-gliadina, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular y tipaje HLA específico de enfermedad celíaca (HLA-DQ).

5.4. PBMCs y cultivos celulares: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los pacientes con enfermedad celíaca activa que mantenían una dieta con gluten, fueron aisladas de 6 mL de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente con HISTOPAQUE (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y, posteriormente cultivadas hasta obtener una densidad de 1x10⁶ células/mL en medio de cultivo RPMI-1640. Tras 48 h, las PBMCs fueron incubadas con los péptidos obtenidos de avenina, gliadina y orzenina (50 ug/mL).

5.5. Análisis de proliferación celular: La proliferación de células T se analizó tras 48 h de incubación utilizando el test ELISA 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) de proliferación celular (Roche, USA). Los resultados se expresaron como densidad óptica (D.O.) a 450 nm. La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de BrdU. Este ensayo colorimétrico consiste en la medida inmunoquímica de la incorporación de BrdU, un análogo de la timidina, a una

cadena de ADN en elongación durante la síntesis activa de este ácido nucleico.

5.6. Producción de INF- γ : Para la determinación de la producción de INF- γ se tomaron, tras 48 h de incubación, alícuotas del sobrenadante de los cultivos de células T y se almacenaron a -80°C . Para el análisis se utilizó un kit ELISA comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, España). La sensibilidad del ensayo fue menor a 2 pg/mL.

5.7. Análisis estadístico de los ensayos de proliferación celular y producción de INF- γ : cada experimento se realizó por duplicado en días diferentes. Los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS de Windows. Cuando la interacción fue significativa, las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante test ANOVA. Para comparar las medias individuales se utilizó el test Bonferroni corregido con la t de Student. Una probabilidad estadística de $p < 0,05$ fue considerada significativa.

La proliferación de PBMC expuestas a las diferentes aveninas, y a los controles positivos y negativos, gliadina y prolaminas de arroz, respectivamente fue expresada en D.O. (Figura 5). De esta manera, tras 48 horas de exposición con los distintos fragmentos de aveninas, encontramos aumentos significativos en la proliferación de células T en los cultivos incubados con la variedad OM719 y con gliadina (D.O.=0,35 y 0,47 respectivamente), y también con OH727 (D.O.=0,24). De esta manera, se observa claramente que la gliadina y OM719 muestran una reactividad más elevada, siendo las de mayor potencial inmunogénico (Figura 5). La incubación con la variedad OF720 mostró un aumento de la proliferación celular (D.O.=0,12) similar a la del control negativo (péptidos de la orzenina) (D.O.=0,11).

El INF- γ es la principal citoquina involucrada en la respuesta inflamatoria de la enfermedad celíaca. Por ello se analizó la secreción de INF- γ en el medio de cultivo tras la exposición de los linfocitos T periféricos a los péptidos de avenina desaminados (Figura 6). Según este análisis, la gliadina y la variedad OM719, fueron muy inmunogénicas presentando los valores de secreción de INF- γ más elevados (0,11 IU/mL y 0,09 IU/mL, respectivamente), mientras que la exposición a OH727 indujo una menor secreción de INF- γ (0,07 IU/mL). Por último, OF720 y el arroz, fueron los menos inmunogénicos (0,024 IU/mL y 0,015 IU/mL, respectivamente).

Ejemplo 6. Detección del potencial inmunotóxico con cereales con otros anticuerpos con reacción cruzada frente al 33-mer.

5 El presente ejemplo demuestra como otros anticuerpos que no han sido creados directamente por inmunización frente al 33-mer pero que lo reconocen, aunque con menor especificidad pueden ser usados para evaluar si las semillas de avena pueden ser inmunogénicas para enfermos celíacos. Aunque trabajos previos establecen que la reactividad del anticuerpo R5 frente a determinados alimentos elaborados con avena se debe a la contaminación con trigo, cebada o centeno, y no a un reconocimiento directo de epítomos de este anticuerpo en las prolaminas de la avena (Pulido y col., 2009, Adv Food Nutr Res., 57:235-285), experimentos realizados para la presente invención demuestran la reactividad del anticuerpo R5 con semillas de avena de pureza controlada molecularmente. Siguiendo las instrucciones del proveedor se determinó la capacidad del moAb R5, anticuerpo específico para la secuencia QQPFP, para detectar las variedades de avena previamente ensayadas. Igualmente, la pureza de las muestras fue controlada mediante PCR con el fin de evitar falsos positivos

10 Los valores de péptido QQPFP obtenidos en las variedades OM719, OA729, OE717 y OH727 oscilaron entre 25,18 y 97,86 mg de péptido/g cereal, lo que correspondería según las instrucciones del proveedor a valores de gliadina de entre 100 y 400 ppm. En las variedades OL715 y OC723 los niveles de péptido estuvieron entre 1,5 y 9,2 mg de péptido/g cereal respectivamente (6,3-37,2 ppm de gliadina, respectivamente). Por lo tanto los resultados obtenidos demuestran que al igual que el moAb G12 y A1, el anticuerpo R5 fue capaz de detectar las variedades descritas. Sin embargo, en las variedades OF720, OR721 y OP722 no se detectó gliadina. Estos resultados son equivalentes a los ya obtenidos mediante ELISA competitivo G12. La detección de péptidos similares a QQPFP en 6 variedades de avena de las 9 ensayadas, demuestra que la señal obtenida por el anticuerpo R5 en muestras de avena es debido al reconocimiento de epítomos potencialmente tóxicos en las prolaminas de este cereal y no a contaminaciones cruzadas con otros cereales.

15
20
25
30

Ejemplo 7. Detección del nivel de péptidos equivalentes a 33-mer en semillas de trigo manipuladas genéticamente.

35 El presente ejemplo muestra como en semillas de cereales manipuladas genéticamente para suprimir los niveles de las gliadinas tóxicas, el nivel de

reactividad con el anticuerpo anti-33-mer disminuye en una medida proporcional a la inmunogenicidad. Las líneas transgénicas publicadas por Gil-Humanes y col. (2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107:17023-17028) fueron analizadas con el anticuerpo monoclonal G12 determinándose la concentración de péptido tóxico presente en cada una de estas líneas con respecto al control.

5

Las líneas transgénicas 28A, 28B, D783, X387, D770, D793, D894 y X077, transformadas con el vector pDhp- ω/α ; E35, transformada con el vector pDhp- ω/α +pghpg8.1; A1152 y C655 transformadas con el vector pghpg8.1 fueron analizadas con respecto al control BW208. La concentración de péptido tóxico 33-mer fue determinada mediante ELISA competitivo G12. El ensayo inmunológico mostró una reducción significativa de los niveles de péptido tóxico superior al 90% en las líneas 28A, 28B, D783, X387, D770, D793 y X077. En contraste, las líneas D894 y E35 presentaron una reducción del 42,42 y 48,57%. Por su parte, las líneas transformadas con el vector pghpg8.1 no mostraron una reducción significativa en los niveles de 33-mer con respecto a la línea BW208.

10

15

Así mismo fueron analizadas otras líneas transgénicas como son D874, D876, X678 (transformadas con el vector pDhp- ω/α), C217 y D598 (transformadas con el vector pghpg8.1) con respecto al control BW2003. D874, D876 y X678 presentaron una reducción superior al 95%. Sin embargo, en las líneas C217 y D598 la reducción del porcentaje de péptido tóxico fue del 52,21 y 43,96%, respectivamente.

20

En este ejemplo se vuelve a demostrar una correlación entre los niveles de péptido tóxico obtenidos con el anticuerpo G12 y los resultados con células T publicados por Gil-Humanes y col. (2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107:17023-17028) en las gliadinas anuladas de las líneas transgénicas empleadas.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1^a.- Método de selección de semillas de cereales caracterizado por el uso de métodos inmunológicos con anticuerpos que reconocen al péptido 33-mer de la gliadina, de forma que cuando no presentan reactividad al gluten extraído de las semillas indican que son tolerables por individuos celíacos.
- 10 2^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos son ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, Western blots, biosensores, que usan al menos un anticuerpo que reconoce el péptido 33-mer de la gliadina.
- 15 3^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos usan al menos un anticuerpo monoclonal con capacidad para detectar los epítomos contenidos en el 33-mer de la gliadina SEQ ID N° 1,, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8..
- 20 4^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos usan al menos un anticuerpo monoclonal de los siguientes G12, el A1 y el R5.
- 25 5^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos usan el anticuerpo monoclonal G12 conjugado a un enzima que permita un ensayo cuantitativo usando sustratos cromogénicos, fluorogénicos o luminiscentes.
- 30 6^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 mediante un ensayo inmunológico según las reivindicaciones del 2-5, caracterizado porque el ensayo podría usar un patrón de gliadina, gliadina hidrolizada, el péptido 33-mer completo o una parte de su secuencia de al menos 6 aminoácidos (SEQ ID N° 2).

5 7^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos están caracterizados por la relación de proporcionalidad entre la señal obtenida con el método objeto de la patente y el daño potencial causado por las proteínas tóxicas en los individuos celíacos medido mediante proliferación celular y producción de INF- γ por células T de pacientes con enfermedad celíaca.

10 8^a.- Método de selección de semillas según reivindicación 1 usando los métodos inmunológicos según reivindicaciones 2-7 en el que las semillas son de trigo, cebada, centeno o avena.

15 9^a.- Método de selección de variedades de semillas según reivindicación 1 usando los métodos inmunológicos según reivindicaciones 2-7 en el que las semillas son avena.

20 10^a.- Método de selección de cultivares de cereales según reivindicación 1 usando los métodos inmunológicos según reivindicaciones 2-7 en el que las semillas son de cereales manipulados genéticamente para disminuir su grado de inmunogenicidad para enfermos celíacos.

25 11^a.- Uso de variedades de cereales seleccionadas según las reivindicaciones 1 a 7 como ingrediente en alimentos que vayan a ser etiquetados como libres de gluten.

12^a.- Uso de cultivares de avenas seleccionadas según las reivindicaciones 1 a 7, como ingrediente en alimentos que vayan a ser etiquetados como libres de gluten.

Figura 1

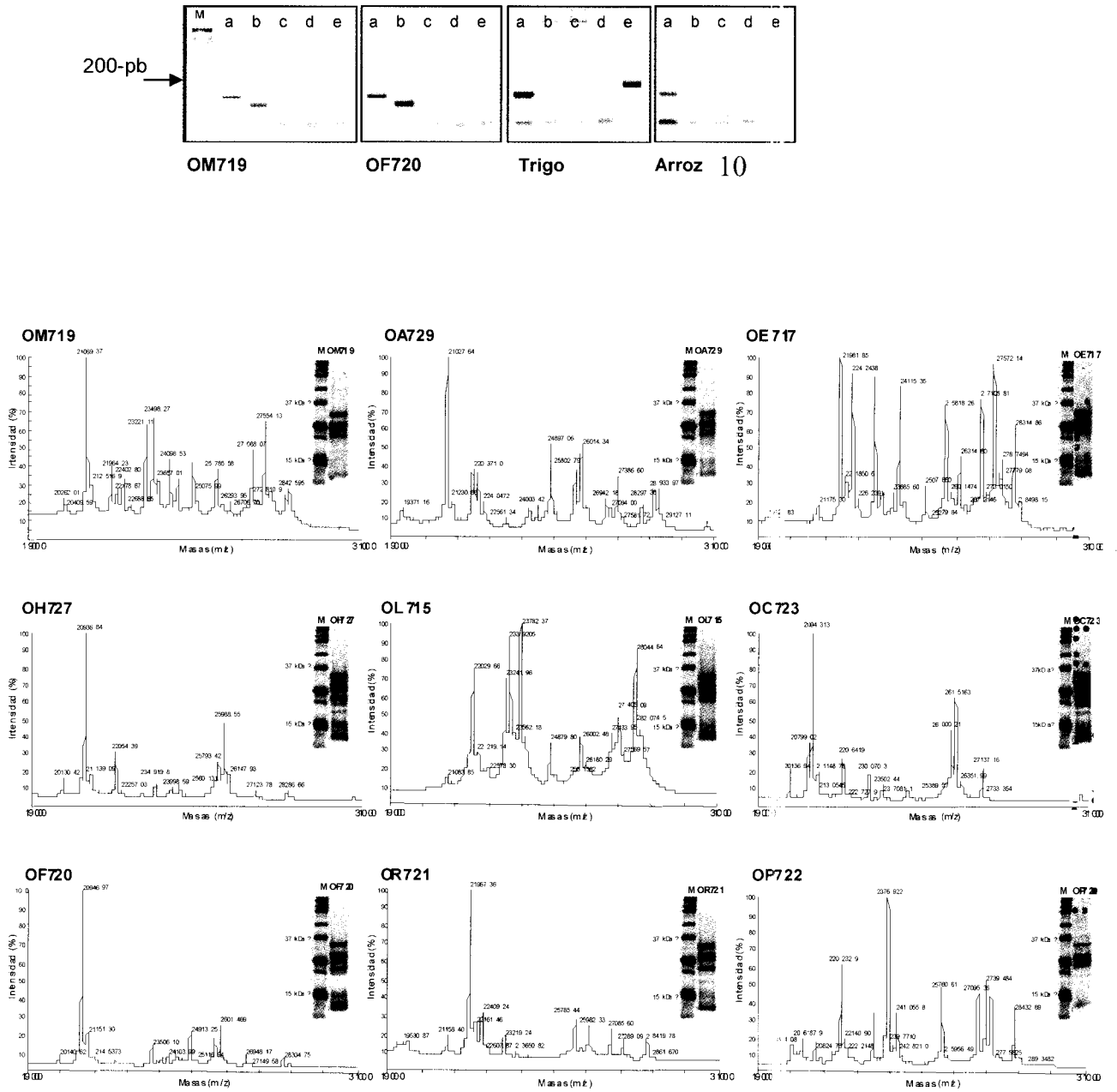


Figura 2

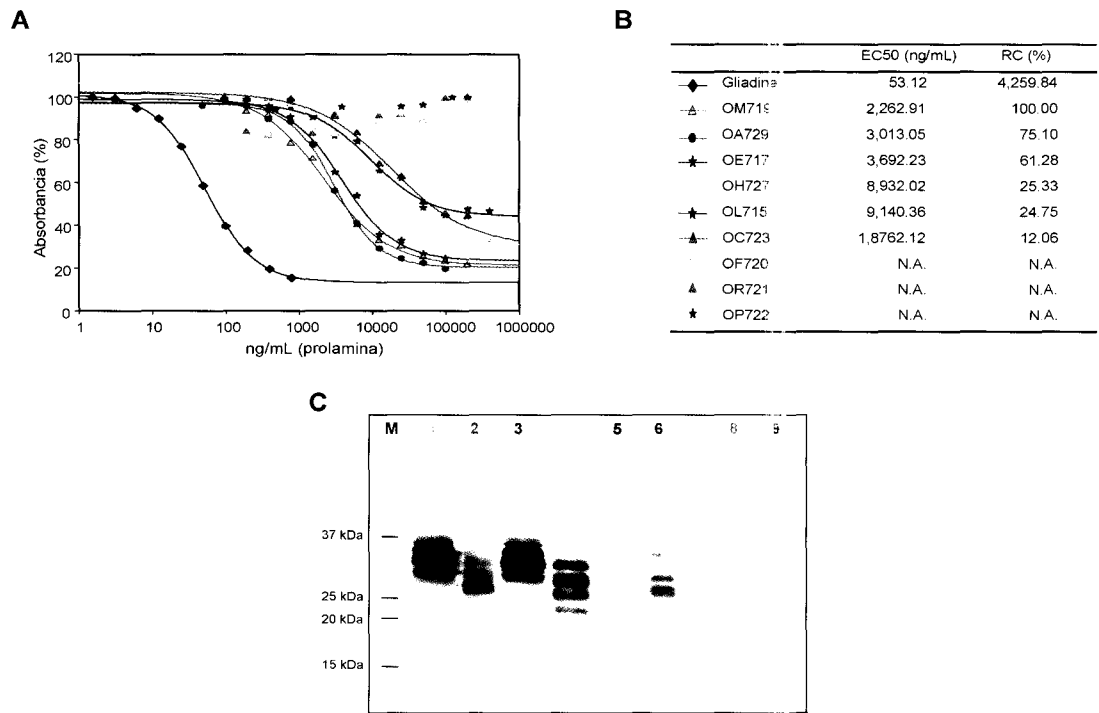


Figura 3

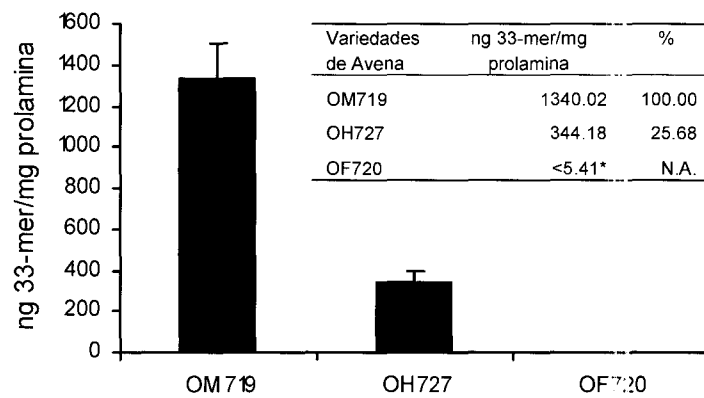


Figura 4

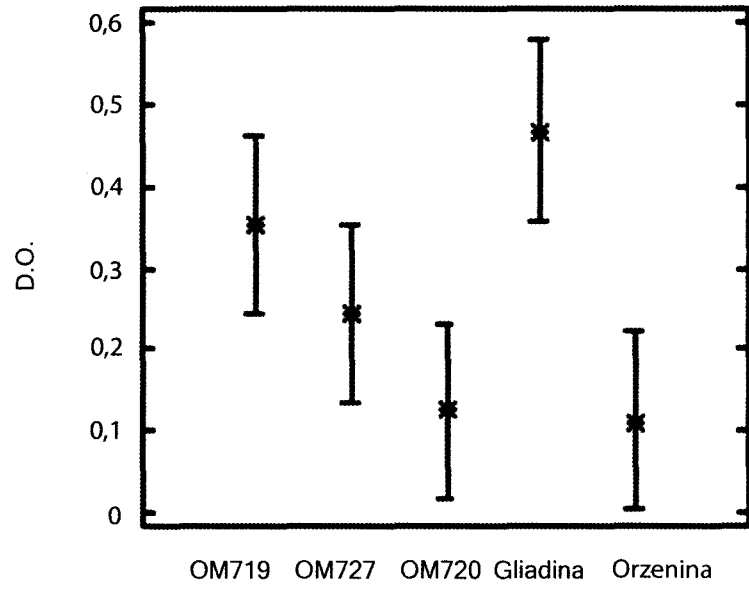


Figura 5

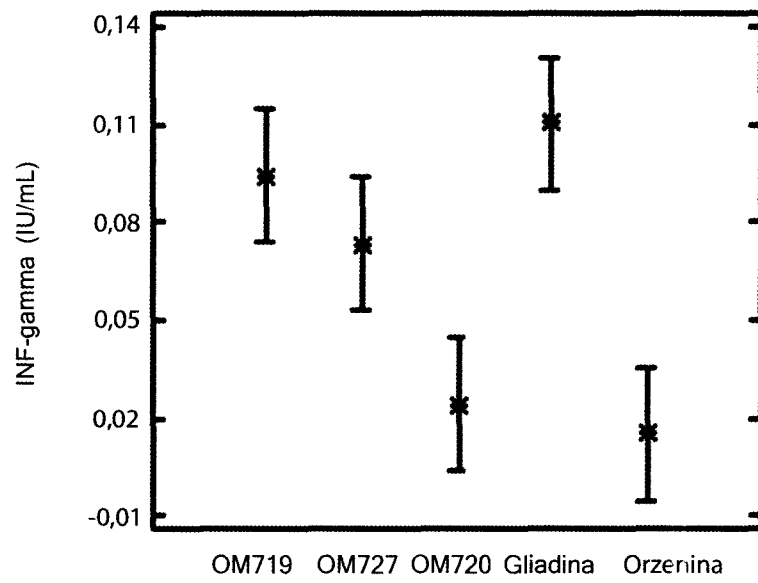


Figura 6

Lista de secuencias

- <110> I. Comino, A. Real, C. Sousa
 <120> Procedimiento para la selección de semillas de cereales aptas para ser consumidas por los enfermos celíacos
- 5 <160> 8
 <210> 1
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
- 10 <400> Lys Gln Lys Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe
 20 25 30
- 15 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
- 20 <400> Gln Pro Gln Lys Pro Tyr
 1 5
- 25 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
- 30 <400> Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5
- 35 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Hordeum* sp.
- 40 <400> Gln Pro Gln Lys Pro Phe
 1 5
- 45 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
- <400> Gln Pro Gln Lys Pro Lys
 1 5
- <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Hordeum* sp.; *Secale* sp.
- <400> Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro
 1 5

ES 2 385 463 B1

5 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> *Hordeum* sp.
<400> Gln Lys Pro Phe Pro Gln Pro
1 5

10 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> *Triticum* sp.
<400> Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201001632

22 Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Int. Cl.: **G01N33/02** (2006.01)
C07K16/16 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MORÓN B., et al. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. 2008. <i>Am. J. Nutr.</i> Vol. 87 páginas 405-414.	1-6,8,10,11
X	MORÓN B., et al. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. 2008. <i>PLoS One</i> . Vol. 3(5) e:2294.	1-6,8,10
A	AMAYA-GONZÁLEZ S., et al. Amperometric quantification of gluten in food samples using an ELISA competitive assay and flow injection analysis. 03.12.2010 (fecha de publicación online). <i>Electroanalysis</i> . Vol. 23(1) páginas 108-114.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.06.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

G01N, C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7, 9, 12	SI
	Reivindicaciones 1-6, 8, 10, 11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 7, 9, 12	SI
	Reivindicaciones 1-6, 8, 10, 11	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MORÓN B., et al. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. <i>Am. J. Nutr.</i> Vol. 87 páginas 405-414.	2008
D02	MORÓN B., et al. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. <i>PLoS One.</i> Vol. 3(5) e:2294.	2008
D03	AMAYA-GONZÁLEZ S., et al. Amperometric quantification of gluten in food samples using an ELISA competitive assay and flow injection analysis. <i>Electroanalysis.</i> Vol. 23(1) páginas 108-114.	03.12.2010

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

La solicitud de patente divulga un procedimiento para la selección de semillas de cereales aptas para ser consumidas por los enfermos celíacos.

Los documentos D01, D02 y D03 muestran procedimientos empleados para detectar toxicidad en alimentos para enfermos celíacos.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En las reivindicaciones 1-6, 8 y 10 se reivindica un método de selección de semillas, que pueden haber sido manipuladas genéticamente, de cereales (trigo, cebada, centeno o avena) caracterizado por el uso de métodos inmunológicos (ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sándwich...) con anticuerpos monoclonales (como el G12 conjugado a un enzima, el A1 y el R5) que reconocen al péptido 33-mer de la gliadina, de forma que cuando no presentan reactividad al gluten extraído de las semillas indican que son tolerables por individuos celíacos. En la reivindicación 11 se reivindica el uso de variedades de cereales seleccionadas según dicho método, como ingrediente en alimentos que vayan a ser etiquetados como libres de gluten.

Los documentos D01 y D02 divulgan métodos inmunológicos (ELISA y Western blots) para analizar fracciones de cereales que son tóxicas para los individuos celíacos. Los métodos emplean anticuerpos monoclonales (como el G12 conjugado a un enzima y el A1) que reconocen el péptido 33-mer. El documento D01 muestra como el método divulgado presenta exactitud, precisión y reproducibilidad para la cuantificación de fracciones tóxicas de gluten para los individuos celíacos y que puede ser una válida herramienta para evaluar la calidad de los alimentos etiquetados como libres de gluten.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02 las reivindicaciones 1-6, 8, 10 y 11 no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.