

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 455**

21 Número de solicitud: 201001633

51 Int. Cl.:

G01N 33/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

28.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.07.2012

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.11.2012

Fecha de la concesión:

13.09.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.09.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SOUSA MARTÍN, Carolina;
COMINO MONTILLA, Isabel;
REAL CALDERÓN, Ana;
VIVAS ALEGRE, Santiago y
CEBOLLA RAMÍREZ, Ángel**

54 Título: **DETERMINACIÓN DE NIVELES DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DEL GLUTEN EN MUESTRAS HUMANAS.**

57 Resumen:

La presente invención, encuadrada en el sector médico-clínico, muestra un procedimiento para la monitorización de la ingestión de gluten mediante la medida de las proteínas/péptidos del gluten en heces con anticuerpos frente a péptidos inmunogénicos resistentes a digestión gastrointestinal. La presencia o ausencia de dichos péptidos inmunogénicos es controlada por ensayos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a péptidos inmunogénicos del gluten que son resistente a proteólisis. Dichos ensayos pueden ser técnicas cuantitativas ELISAs, o cualitativos como ensayos inmunocromatográficos rápidos, inmunoblots, etc. Estas medidas también se podrían aplicar para verificar el cumplimiento de la dieta sin gluten, para mejorar el diagnóstico en casos de síntomas refractarios o agudos de la enfermedad celíaca en casos donde supuestamente se está respetando una dieta sin gluten, o a la investigación clínica de la efectividad de las terapias enzimáticas relacionadas con desintoxicación de las prolaminas.

ES 2 385 455 B2

DESCRIPCIÓN

Determinación de niveles de péptidos inmunogénicos del gluten en muestras humanas

OBJETO DE LA INVENCION

5

La presente invención, encuadrada en el sector médico-clínico, muestra un procedimiento para la monitorización de la ingestión de gluten mediante la medida de las proteínas/péptidos del gluten en heces con anticuerpos frente a péptidos inmunogénicos resistentes a digestión gastrointestinal. La presencia o ausencia de dichos péptidos inmunogénicos es controlada por ensayos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a péptidos inmunogénicos del gluten que son resistente a proteólisis. Dichos ensayos pueden ser técnicas cuantitativas ELISAs, o cualitativos como ensayos inmunocromatográficos rápidos, inmunoblots, etc. Estas medidas también se podrían aplicar para verificar el cumplimiento de la dieta sin gluten, para mejorar el diagnóstico en casos de síntomas refractarios o agudos de la enfermedad celíaca en casos donde supuestamente se está respetando una dieta sin gluten, o a la investigación clínica de la efectividad de las terapias enzimáticas relacionadas con desintoxicación de las prolaminas.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El gluten es un conjunto de proteínas de almacenamiento de los cereales. Las proteínas del gluten procedentes del trigo, la cebada, el centeno y, probablemente la avena, no son toleradas por individuos predispuestos genéticamente que padecen la enfermedad celíaca (EC). En el trigo, el gluten está compuesto por una fracción soluble en etanol (prolaminas: α , β , γ y ω -gliadinas); y otra insoluble, gluteninas (de alto y bajo peso molecular) (Wieser, 2007, Food Microbiol., 24:115-119; Fasano, 2009, Sci Am., 301:54-61). Las gliadinas, así como también las gluteninas, son inusualmente ricas en

residuos de prolina (~15%) y glutamina (~35%). Como resultado, mientras que la mayoría de las proteínas de la dieta son digeridas mediante proteasas gastrointestinales a aminoácidos simples, dipéptidos o tripéptidos, las proteínas del gluten no son completamente digeridas (Erickson y Kim, 1990, *Annu Rev Med.*, 41:133-139; Gray, 1991, New York:Oxford University, pp.411-420; Ganapathy y col., 2006, Academic Press, pp.1667-1692). Por lo tanto, algunos de los péptidos del gluten generados durante la digestión gastrointestinal son altamente resistentes a la digestión por parte de las enzimas gástricas y pancreáticas, por lo que persisten en el intestino. Estos péptidos son capaces de internalizarse en las células intestinales y, como consecuencia, los residuos de glutamina que poseen pueden ser desaminados por la transglutaminasa tisular (tTG). La predisposición genética de los individuos con EC hace que sean intolerantes a dichos péptidos debido a que su sistema inmunológico reacciona de manera patológica contra autoantígenos resultantes de la interacción -péptidos del gluten/tTG- (Korponay-Szabó y col., 2007, *BMJ*, 335:1244-1247; Bethune y Khosla, 2008, *PloS Pathogens*, 4:e34; Jabri y Sollid, 2009, *Nat Rev Immunol.*, 9:858-870). Los péptidos desaminados inducen una reacción inmunológica mediada por células T que ocasiona inflamación crónica del intestino delgado. Las vellosidades intestinales son destruidas debido a la reacción inmunológica, produciéndose disminución de la absorción intestinal que puede dar lugar a síntomas como diarrea, anemia, retraso en el crecimiento, pérdida de peso, desórdenes óseos, complicaciones neurológicas, cáncer, etc. (Alaedini y Green, 2005, *Ann Int Med.*, 142:289-299; Catassi y Fasano, 2008, *Curr Opin Gastroenterol.*, 24:687-691; Tack y col., 2010, *Gastroenterol Hepatol.*, 7:204-213).

Uno de los principales péptidos del gluten descritos hasta la fecha es el péptido 33-mer de la α 2-gliadina (Shan y col., 2002, *Science*, 297:2275-2279; Bethune y col., 2009, *Chem Biol.*, 16:868-881) que ha demostrado ser resistente a la digestión gastrointestinal, sustrato de la desaminación mediada por la tTG y altamente reactivo frente a las células T aisladas de pacientes celíacos. La identificación del péptido 33-mer, así como otros péptidos, contribuye a demostrar que los epítomos del gluten con elevada antigenicidad están localizados en regiones de las gliadinas ricas en residuos de prolina y glutamina (Shan y col., 2002, *Science*, 297:2275-2279; Tye-Din y col., 2010, *Sci Transl*

Med., 2:41ra51).

5 La única terapia existente a día de hoy para los pacientes celíacos es una rigurosa dieta sin gluten (DSG). El incumplimiento de la DSG se ha asociado con osteoporosis, anemia por deficiencia de hierro, depresión e infertilidad, todo lo cual se mejora, en cierta medida, mediante la adhesión a la dieta libre de gluten. Estas observaciones nos dan una idea de la importancia de la adherencia a una DSG para reducir los síntomas, evitar deficiencias nutricionales y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, varios estudios basados en biopsias intestinales han sugerido que las transgresiones de la dieta son relativamente frecuentes, estando entre el 32,6% y el 55,4% en las poblaciones estudiadas (Ciacci y col., 2002, *Digestion*, 66:178-185; Silvester y Rashid, 2007, *Can J Gastroenterol.*, 21:557-564). La falta de adherencia a una dieta libre de gluten de manera estricta es la principal razón de enfermedad celíaca mal controlada en adultos.

15 Así mismo existe una parte de la población celíaca que no parece responder de manera positiva a la DSG y sufren síntomas de malabsorción persistente o recurrente y atrofia de las vellosidades intestinales. Esta población podría ser sospechosa de padecer EC refractaria, una enfermedad rara (aproximadamente el 5%-10% de los pacientes con EC) que aparece en los pacientes sin aparente respuesta positiva a la dieta libre de gluten (Al-Toma y col., 2007, *Dig Dis*, 25:230-236; Freeman, 2009, *Gut Liver*, 3:237-246; Rubio-Tapia y Murray, 2010, *Gut*, 59:547-557). Aunque esta enfermedad refractaria fue descrita en pacientes con supuesta ausencia total de ingesta de gluten, la ingestión involuntaria y la hipersensibilidad a una pequeña cantidad de gluten también pueden desencadenar los síntomas propios de la patología. La falta de un marcador preciso para el control del cumplimiento de la DSG es pues todavía una cuestión sin resolver y es especialmente difícil en el caso de leves transgresiones dietéticas (Fernández-Calle y col., 1993, *Gut*, 34:774-777). No hay manera de demostrar la ingesta de gluten y así evitar posibles secuelas nocivas, de hecho sólo se puede medir las consecuencias de las

transgresiones dietéticas observando la inflamación de las mucosas y/o la atrofia vellositaria para lo cual se tendría que realizar biopsias intestinales y como consecuencia anestesiar al paciente con las posibles consecuencias que ello pueda tener.

5 El control de la anti-tTG, que ha sido propuesto como un marcador para evaluar el estricto cumplimiento de la DSG, sin embargo la eficacia de dicho marcador para controlar la ingesta de gluten aún no está clara (Tack y col., 2010, Gastroenterol Hepatol., 7:204-213). Otros marcadores han sido propuestos para el seguimiento de la dieta, como por ejemplo la prueba de permeabilidad (Duerksen et al., 2005) o la calprotectina fecal (Ertekin y col., 2010, J Clin Gastroenterol., 44:544-546.) Estos
10 métodos pueden mostrar que existen procesos inflamatorios, de tal manera que si los valores de estos marcadores se encuentran modificados puede ser como consecuencia de enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias intestinales o de procesos de alergia, lo que significa que no tienen por qué ser una medida del consumo directo de gluten. Por lo tanto, no existe un método eficaz para comprobar que el enfermo celíaco
15 esté realizando una DSG o descartar la posibilidad de que los síntomas de la EC refractaria sean debidos a una intolerancia hipersensible a trazas de gluten asociada a una exposición involuntaria a los cereales tóxicos.

El cumplimiento de la dieta evaluado mediante entrevista ha sido sugerido como
20 marcador de control de la EC por su bajo coste, su no invasividad, y su demostrada correlación con el daño intestinal. Sin embargo, la DSG supone numerosas restricciones para los pacientes debido a sus implicaciones sociales y económicas. Además, una dieta libre de gluten es difícil de mantener debido a la ubicuidad del gluten en los alimentos, a la desinformación educativa, a las variaciones en el etiquetado de los alimentos y a la
25 posible contaminación cruzada de éstos (Bethune y col., 2009, Chem Biol., 16:868-881; Selimoglu y Karabiter, 2010, J Clin Gastroenterol., 44:4-8). Por otra parte, ciertos estilos de vida y algunos sectores de la población dificultan, en cierta medida, el cumplimiento de la DSG. Además no existe una alternativa a las entrevistas a los pacientes para

conocer cuánto de fiables son los resultados obtenidos de estos estudios clínicos.

Una medida más directa sobre la ingestión de gluten podría proporcionar información crítica sobre el paciente: la detección del incumplimiento de la DSG antes del daño anatómico, la detección del consumo inadvertido, la evaluación de la exactitud de la adherencia al tratamiento en el periodo inicial tras el diagnóstico cuando los pacientes están menos familiarizados con la dieta, etc., proporcionando una confirmación fácil y fiable de los resultados obtenidos. Por tanto, un marcador sensible y fiable para monitorizar y detectar la ingesta de gluten podría ser una herramienta útil para el correcto cumplimiento de la DSG y, probablemente, para un diagnóstico preciso de la EC refractaria.

Los anticuerpos monoclonales (moAbs) G12 y A1 obtenidos frente al principal epítipo inmunogénico de la α -gliadina han demostrado ser muy útiles en la detección de péptidos tóxicos en muestras de alimentos, así como en investigación clínica de desintoxicación enzimática del gluten (Morón y col., 2008, Am J Clin Nutr., 87:405-414; Morón y col., 2008, PLoS ONE, 3:e2294; Ehren y col., 2009, PLoS ONE, 4:e6313; Alvine Pharmaceuticals, Inc., Biomedal S.L.). La sensibilidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales y su capacidad para reconocer péptidos resistentes a la digestión gastrointestinal los podrían hacer ideales para la monitorización de péptidos inmunotóxicos del gluten obtenidos tras digestión intestinal en muestras humanas. Los epítipos de reconocimiento del moAb G12; SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4; están presentes en los principales péptidos descritos recientemente en un rastreo de alto rendimiento realizado con 2.700 péptidos procedentes de prolaminas de diferentes cereales (Tye-Din y col., 2010, Sci Transl Med., 2:41ra51). Los fragmentos peptídicos no digeridos procedentes de la ingesta de gluten y no absorbidos, podrían ser recuperados de las heces, lo que demostraría la ingesta de gluten del individuo.

En esta patente, hemos evaluado la viabilidad de la monitorización de gluten intacto y digerido en las heces mediante la detección de epítipos relacionados con el

péptido 33-mer, que podría ser aplicada en estudios clínicos y de seguimiento de la dieta, así como también, en el diagnóstico de la EC refractaria.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La dieta sin gluten es el único tratamiento efectivo a día de hoy para la enfermedad celíaca. Por ello, el cumplimiento de la DSG en los pacientes debe ser monitorizado para evitar daños acumulativos directos e indirectos, así como también, para confirmar que la persistencia de cualquier síntoma típico de la celíaca no se debe a una infracción(voluntaria o no) de la dieta. Sin embargo, actualmente no se dispone de
10 métodos para controlar el cumplimiento de la dieta en pacientes con enfermedad celíaca.

La presente invención tiene como objeto la aplicación de métodos inmunológicos para monitorizar el cumplimiento de la dieta libre de gluten mediante la detección en heces de péptidos inmunotóxicos resistentes a digestión gastrointestinal. Es objeto de la invención la aplicación de técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos que reconocen
15 péptidos inmunogénicos del gluten que resisten la digestión gastrointestinal. Preferentemente, la invención emplea técnicas inmunológicas que usan anticuerpos que reconocen el péptido 33-mer de la gliadina. Se tendría una forma preferente de realizarse la detección de los péptidos mediante métodos cualitativos rápidos basado en tiras
20 inmunocromatográficas o bien por métodos cuantitativos y automatizables como las técnicas de ELISA. El método preferente usado en la invención debe permitir detectar gluten ingerido equivalente a 50 mgs de gluten de trigo por día, que es la cantidad máxima descrita para una dieta sin gluten, o en su caso un mínimo de 20 ppms de gluten equivalente en heces.

Es objeto también de la presente patente kits o dispositivos analíticos
25 inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente al 33-mer de gliadina que estén indicados para la detección de los péptidos del gluten en heces.

Dicho procedimiento y kits analíticos tienen también su objeto de la patente en su uso para revelar la falta de adherencia a la DSG, ya sea debido a la contaminación de los alimentos consumidos o a una ingesta voluntaria/involuntaria ocasional de alimentos que contienen gluten. Además, es objeto de la presente invención la aplicación de la
5 detección de dichos péptidos inmunotóxicos en heces para el control de la investigación clínica sobre la enfermedad celíaca, incluidas las terapias enzimáticas relacionadas con desintoxicación de las prolaminas del gluten, secuestrantes de péptidos inmunotóxicos, y otras terapias alternativas.

El objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento para detección o
10 monitorización del gluten ingerido mediante detección de péptidos inmunotóxicos en las heces, caracterizado por el uso de métodos inmunológicos con anticuerpos que reconocen, preferentemente a epítomos relacionados con el péptido 33-mer de la gliadina y otras secuencias peptídicas resistentes a las digestión gastrointestinal.

Es objeto de la presente invención el uso de técnicas inmunológicas para dicha
15 monitorización de gluten, métodos inmunológicos tales como ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, Western blot, biosensores basados en reacciones electroquímicas catalizadas por enzimas acoplados a los anticuerpos, por partículas magnéticas tapizadas por anticuerpos, por resonancia de plasmones superficiales, y demás técnicas
20 en las que se detecta la unión de un analito a un anticuerpo.

En una forma preferente de la invención, estos métodos se caracterizan porque emplean preferentemente uno o varios anticuerpos monoclonales con capacidad para detectar epítomos contenidos o similares al péptido 33-mer (SEQ ID N° 5), como pueden ser las secuencias siguientes: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7,
25 SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10. En una forma preferente de la invención los anticuerpos usados por las técnicas inmunológicas serían el G12 y el A1 por su demostrada relación de su reactividad con la potencial inmunotoxicidad de una muestra. También contempla la invención el uso del anticuerpo R5 que reacciona con el epítomo SEQ ID N° 11, que también puede hallarse en péptidos del gluten resistente a digestión

gastrointestinal, pero con menor especificidad antes péptidos inmunogénicos resistentes a las proteasas.

Una forma preferente de la invención sería el empleo de métodos inmunológicos basados en el anticuerpo monoclonal G12 conjugado a un enzima que permita un ensayo
5 cuantitativo usando sustratos cromogénicos, fluorogénicos o luminiscentes. Este procedimiento podría usar un patrón de gliadina, gliadina hidrolizada, péptido 33-mer completo o una parte de su secuencia de al menos 6 aminoácidos (SEQ ID N° 1).

Otro objeto de la invención lo constituyen el uso particular de tiras inmunocromatográficas basadas en los anticuerpos anti-33-mer de gliadina, G12 y A1
10 que permiten una detección semicuantitativa y rápida de los péptidos/proteínas del gluten contenidos en las heces.

La invención propone una medida del gluten ingerido por el individuo a través de la dieta. Se trata de un procedimiento útil para el control del gluten ingerido mediante el empleo de métodos analíticos en los que se ha demostrado una correlación entre la
15 cantidad de gluten ingerida y las estimaciones de proteínas/péptidos del gluten en heces obtenidas a través de estos procedimientos.

La invención propone un instrumento analítico para la monitorización del cumplimiento de la DSG, así como también para descartar la ingesta no controlada de gluten en los pacientes sospechosos de sufrir la llamada enfermedad celíaca refractaria.
20 Además, con este procedimiento, las nuevas alternativas terapéuticas para la desintoxicación enzimática del gluten y otra terapias alternativas también podrán ser controladas en las heces de los pacientes celíacos sometidos a ensayos clínicos o a una prescripción terapéutica en el futuro, ya que la efectividad de la terapia se podría determinar midiendo la presencia o ausencia de péptidos en heces tras 12-48 horas de la
25 ingesta de alguna cantidad controlada de gluten junto con las terapias que eliminan los péptidos inmunotóxicos

Cuestiones aún sin resolver en la práctica clínica, como son el control de una DSG o el control de la exposición involuntaria al gluten por contaminación de los alimentos, podrían ser resueltas con simples ensayos inmunológicos de las heces.
30 Médicos, clínicos y analistas podrían considerar útiles estos métodos para el diseño de

ensayos clínicos y seguimientos de sus pacientes celíacos a para establecer conclusiones coherentes sobre el estado de la enfermedad del paciente.

La extracción de los péptidos en las heces se puede llevar a cabo directamente con una solución hidroalcohólica del 40 al 60%. En algunas ocasiones por la naturaleza
5 del alimento ingerido, podría mejorarse la extracción del gluten en heces añadiendo una solución con agentes dispersantes como el cloruro de guanidinio, el cloruro de arginina, etc; o bien detergentes como la polivinilpirrolidona, y agentes reductores como el b-mercaptoetanol, el DTT o el TCEP.

Posteriormente los polipéptidos del gluten extraídos se diluyen en una solución
10 salina tamponada y se usan entonces para hacer la medida con un ELISA, bien competitivo, bien sandwich si se quiere tener una idea de la concentración de los péptidos reactivos. La recta patrón se podría hacer con gliadina estándar pepsino-tripsinada, para simular su digestión gástrica, También se podría usar directamente
15 polipéptido sintetizado que reaccione con los anticuerpos, preferentemente, el 33-mer de gliadina o fragmentos del mismo con la opción de poner algunas modificaciones puntuales que mantengan la reactividad frente a los anticuerpos. Así por ejemplo se podrían usar los péptidos siguientes para los anticuerpos G12: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, y SEQ ID N° 6. Para el A1 además del 33-mer serían válidos los
20 péptidos SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 o SEQ ID N° 10 para hacer la recta patrón con un ELISA competitivo.

Para un ensayo cualitativo en las que se viera si el valor de polipéptidos del gluten en heces es mayor o menor de una cierta cantidad, se podría usar una tiras
25 inmunocromatográficas que usen el anticuerpo G12 o A1 o bien ambos. El procedimiento se podría llevar a cabo con un kit que contuviese la solución de extracción de los polipéptidos en heces; un patrón de referencia con polipéptidos del gluten hidrolizados por pepsina y tripsina o bien sintetizados; y los componentes de un ELISA con una placa multipocillo y usando los anticuerpos A1 y/o G12 para inmovilizar los pocillos y/o para el

revelado del ensayo, o bien tiras inmunocromatográficas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

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:

10

Figura 1. Afinidad relativa del moAb G12 frente a péptidos inmunotóxicos derivados de la gliadina PWG tras simulación de la digestión gastrointestinal. **A** y **B.** SDS-PAGE y Western blot de gliadina PWG, PWG gliadina + pepsina y gliadina PWG + pepsina + tripsina/quimotripsina. Las muestras fueron teñidas con plata o transferidas a una membrana de PVDF con el moAb G12. PM: marcador de peso molecular. **C.** Análisis mediante ELISA competitivo G12-HRP de los péptidos procedentes de la gliadina PWG.

15

20

Figura 2. Resistencia del péptido 33-mer a la ruptura mediante enzimas gastrointestinales. **A.** Secuencia de aminoácidos del péptido 33-mer. La secuencia de reconocimiento del moAb G12 en el péptido 33-mer aparece en negrita. **B.** ELISA competitivo para la detección de 33-mer tras tratamiento con pepsina, tripsina y quimotripsina mediante el uso del moAb G12-HRP. **C.** Western blot del péptido 33-mer tras tratamiento con enzimas gastrointestinales. PM: marcador de peso molecular. Se realizaron dos ensayos por separado con 3 repeticiones cada uno.

25

Figura 3. Detección de gluten en las heces de individuos sanos sometidos a una dieta controlada de gluten. **A y B.** Semicuantificación de péptidos/proteínas del gluten en las heces de individuos sanos (n=11) mediante inmunocromatografía G12. La franja azul es un control interno positivo que indica que el dispositivo ha funcionado correctamente, y la franja rosa indica la presencia de gluten. HL901-5 HL911: sujetos que intervinieron en el estudio. *Se detectaron trazas de gluten. **C y D.** SDS-PAGE y Western blot de los péptidos de gluten y proteínas extraídas de las heces. PM: marcador de peso molecular.

Figura 4. Concentración de péptido 33-mer (ng/mg) en las heces tras una dieta controlada de gluten. ELISA competitivo G12-HRP para conocer la relación entre las proteínas del gluten ingeridas/excretas mediante su contenido en péptido 33-mer. La concentración de péptido 33-mer se determinó mediante con una curva estándar de 33-mer. Dos ensayos se realizaron por separado, cada uno con tres 15 repeticiones.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Cuantificación de los péptidos tóxicos de la gliadina PWG obtenidos tras simulación de la digestión gastrointestinal.

En el presente ejemplo se muestra como una parte sustancial de los péptidos inmunogénicos del gluten, permanecen susceptibles de detección en heces a pesar de la digestión gastrointestinal. Entre las principales proteínas de la dieta, las que forman parte del gluten son las únicas que contienen aproximadamente un 15% de residuos de prolina y un 35% de residuos de glutamina. El alto contenido en estos dos aminoácidos impide la completa proteólisis de estas proteínas por parte de las enzimas gástricas y 25

pancreáticas, de manera que se forman fragmentos peptídicos en el intestino delgado que son inmunotóxicos para los pacientes celíacos. En particular, el péptido 33-mer fue encontrado 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 de las células T y es altamente resistente a la proteólisis.

5 El moAb G12 es específico para el epítipo de 6 aminoácidos SEQ ID N° 1, con 3 repeticiones en el péptido 33-mer. Además, este anticuerpo es capaz de reconocer otros péptidos inmunoreactivos contenidos en las gliadinas y otras prolaminas tóxicas. El objetivo de este ejemplo es mostrar como es conocer la capacidad del anticuerpo G12
10 para detectar los péptidos tóxicos formados tras la simulación gastrointestinal de la gliadina. Para la estandarización de este ensayo se utilizó la gliadina PWG, considerada como un reactivo de referencia internacional en los análisis de gluten debido a su alto contenido en gliadinas, su buena solubilidad, su homogeneidad, su estabilidad y por estar constituida por 28 cultivares de trigo europeo (Eckert y col., 2006, J Cereal Sci., 43:331-
15 341).

La gliadina fue sometida a digestión secuencial con pepsina (la principal proteasa presente en el estómago), con tripsina y quimotripsina (proteasas contenidas en la membrana intestinal). Las muestras fueron incubadas a 37 °C en solución de HCl (pH 2) que contenía 0,06 mg/ml de pepsina. Las muestras fueron incubadas durante 60 min y se
20 desactivaron mediante calor a 95 °C durante 5 min. Después de la simulación gástrica con pepsina, las digestiones se ajustaron a pH 6.0 con tampón fosfato sódico, e incubados con proteasas pancreáticas: tripsina (0,375 mg/ml) y quimotripsina (0,375 mg/ml). Tras la simulación duodenal a 37 °C durante 30 min y las muestras fueron inmediatamente inactivadas a 95 °C durante 5 min.

25 El perfil proteico de las fracciones de prolaminas que constituyen la gliadina PWG fue analizado mediante SDS-PAGE con el fin de observar el patrón de bandas obtenido tras el tratamiento enzimático y confirmar que las muestras habían sido digeridas. Para el análisis mediante SDS-PAGE, las muestras 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 15-18% (SDS-PAGE) 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 estudio de la gliadina PWG intacta mediante gel 1D reveló bandas intensas de alfa, beta y gamma gliadinas ($P_m = 33-45$ kDa) y bandas débiles de omega gliadina ($P_m = 50-67$ kDa) (Eckert y col., 2006, *J Cereal Sci.*, 43:331-341). La digestión de estas proteínas mediada por pepsina (digestión gástrica) dio lugar a la formación de fragmentos peptídicos de menor tamaño, inferiores a 25 kDa. Secuencialmente, la digestión con tripsina y quimotripsina generó péptidos más pequeños (inferiores a 15 kDa), como consecuencia del proceso de hidrólisis mediado por estas enzimas (**Figura 1A**).

Con el objetivo de comprobar si los péptidos de la gliadina PWG obtenidos mediante el proceso de digestión gastrointestinal eran reconocidos por el anticuerpo anti-33-mer se realizó un Western blot con dicho anticuerpo de las muestras descritas anteriormente: gliadina PWG sin digerir, gliadina PWG sometida a digestión gástrica y gliadina PWG sometida a digestión intestinal (previa digestión gástrica). 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.

El anticuerpo G12 fue capaz de reconocer las distintas fracciones que componen la gliadina PWG. Tras digestión gástrica, los fragmentos peptídicos formados continuaron siendo reconocidos por el anticuerpo G12 (**Figura 1B**). El tratamiento secuencial con enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina) dio lugar a la presencia de péptidos más

pequeños también reconocidos mediante moAb G12.

Con el fin de conocer la capacidad del anticuerpo G12 para cuantificar los péptidos tóxicos generados, se determinó la concentración de 33-mer y péptidos análogos obtenidos tras simulación gastrointestinal de la gliadina PWG mediante ELISA competitivo, usando igualmente el anticuerpo G12. El ELISA competitivo es una técnica muy apropiada para el seguimiento de la digestión del gluten, ya que es capaz de detectar tanto proteínas intactas como pequeños fragmentos de proteínas: estos últimos podrían ser subestimados con ELISA sándwich, debido a que para la detección de antígenos requiere como mínimo dos epítomos diferentes por molécula de péptido.

La cantidad relativa de epítomos inmunotóxicos contenida en las muestras se cuantificó mediante ELISA competitivo con el uso del moAb G12-HRP (Biomedal S.L., Sevilla, España). 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% Tween® 20 y bloqueadas con solución de bloqueo (PBS, 5% leche desnatada) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas del patrón (gliadina o péptido 33-mer) 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 (1:10.000 en PBS con BSA 3%). Se preincubaron las muestras 1 h a temperatura 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.). Transcurridos 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 nm (Lector de microplacas UVM340, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria). La concentración de gliadina/33-mer se determinó usando el modelo de los 4 parámetros.

Con este método, se determinó la concentración de 33-mer tanto en la gliadina PWG intacta como sometida a digestión gástrica y a digestión intestinal. La digestión gástrica de la gliadina PWG dio lugar a un ligero aumento en los niveles de péptido

tóxico. Posiblemente este aumento es debido a la apertura de las moléculas que constituyen las fracciones de gliadina, de esta manera los epitopos del anti-33-mer presentes quedan más accesibles, y por tanto, se identifican con mayor especificidad (gliadina PWG intacta=21,6 ng 33-mer/ μ g vs. Gliadina PWG digestión gástrica=24,5 ng 33-mer/ μ g). Tras el proceso sucesivo de digestión intestinal el moAb G12 continúa reconociendo los péptidos de la gliadina PWG formados, aunque con menor especificidad (7,5 ng 33-mer/ μ g) (**Figura 1C**).

En contraste con estos resultados, estudios *in vitro* e *in vivo* realizados con el péptido 33-mer demuestran la gran estabilidad de este péptido a la ruptura mediante endoproteasas gástricas, pancreáticas e intestinales. Sus características hacen que sea sugerido como el principal promotor de la respuesta inflamatoria al gluten en pacientes celíacos (**Figura 2A**) (Shan y col., 2002, Science, 297:2275-2279; 2005, J Proteome Res., 4:1732-1741).

Con el objetivo de verificar que el péptido 33-mer permanece intacto tras proteólisis gástrica (mediada por pepsina) y secuencial proteólisis intestinal (mediada principalmente por tripsina y quimotripsina) se realizó una simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de dicho péptido. Las concentraciones de péptido 33-mer obtenidas tras cada uno de los procesos de digestión se determinaron mediante ELISA competitivo usando el anticuerpo monoclonal anti-33-mer. La concentración de 33-mer obtenida tras digestión gástrica no varió significativamente con respecto al péptido no sometido a digestión (194 μ g/mL vs. 186 μ g/mL, respectivamente, $p=0,4469$). Igualmente, la exposición del 33-mer a las enzimas tripsina y quimotripsina (digestión intestinal), no supuso una variación de los niveles de este péptido en comparación con el péptido no tratado (169 μ g/mL vs. 186 μ g/mL, respectivamente, $p=0,1024$) (**Figura 2B**). Estos resultados confirman la gran estabilidad del 33-mer a la hidrólisis por parte de las enzimas implicadas en el proceso digestivo.

Los resultados obtenidos mediante ELISA fueron confirmados mediante análisis Western blot. Tricina-SDS-PAGE y Western blot se realizaron en condiciones estándar

(Sousa y col., 2001, Mol Cellular Biol., 7:204-213). El inmunoblotting mostró bandas de aproximadamente 3,5 kDa tanto en la muestra que contenga 33-mer no procesado como en aquella que contenía 33-mer sujeto a digestión gastrointestinal (Peso molecular teórico 33-mer 3,9 kDa, PIR, Protein Information Resource, Georgetown University Medical Center, E.E.U.U.) (Figura 2C).

Del mismo modo, la capacidad del moAb G12 para detectar hidrolizados se evaluó mediante un sistema de detección rápida de gluten, las tiras inmunocromatográficas basadas en el moAb G12 (GlutenTox stick, Biomedal S.L.). El límite de detección de la gliadina y la gliadina hidrolizada fue de 30 ng/ml (6 ppm de gluten) y 50 ng/ml (10 ppm de gluten hidrolizado), respectivamente, mientras que para el péptido 33-mer y el péptido 33-mer sometido a digestión fue de 0,5 ng/mL en ambos casos. Estos resultados sugieren que el método de análisis presenta una alta sensibilidad tanto frente a las proteínas/péptidos intactos como frente a sus respectivos hidrolizados.

Los resultados obtenidos mediante Western blot, ELISA competitivo y tiras inmunocromatográficas sugieren que el anti-33-mer G12 podría ser usado para controlar la presencia de los péptidos tóxicos de la gliadina y otras prolaminas de gluten durante el proceso digestivo. Al menos un tercio de los péptidos reactivos para G12 se mantuvieron resistentes a la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, una parte sustancial de los epítopos de las prolaminas de los alimentos ingeridos que fueron detectados con moAb G12 podrían ser resistentes a la digestión gastrointestinal y su detección podría ser adecuada en el tubo gastrointestinal.

Ejemplo 2. Detección y semicuantificación de péptidos/proteínas del gluten en heces de individuos sanos sometidos a una dieta controlada de gluten.

En el presente ejemplo se muestra como ocurre la digestión que sufren las proteínas del gluten *in vivo* en individuos sanos y como determinar la capacidad del moAb G12 para detectar dichas proteínas/péptidos excretados a través de las heces. Se llevó a cabo un ensayo en el que se controló el tipo y la cantidad de gluten consumido en

individuos sanos (n=11, 7 mujeres y 4 hombres, edad media 24-42 años). Los criterios de inclusión comprenden la ausencia de enfermedades, síntomas digestivos, medicamentos, antibióticos en los últimos dos meses y ausencia de historia familiar de EC. Todos los participantes fueron evaluados para la EC, mostraron niveles de tTG sérica normales y su fenotipo HLA-DQ no fue DQ-2/-8. Los niveles de hemoglobina y el análisis de bioquímico de sangre, incluyendo las pruebas renales y hepáticas, estaban dentro de los valores normales. El comité de Ético local del "Hospital Universitario de León", fue aprobado para este estudio y se obtuvo el consentimiento informado de los sujetos.

Para este estudio se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Dieta:

Los sujetos fueron instruidos para cumplir una dieta en la que controló el tipo y la cantidad de gluten consumido durante los 15 días que duró este estudio. En primer lugar, los sujetos consumieron una dieta libre de gluten estricta durante una semana. Los siguientes 4 días, 9 g de gluten no procesado fueron ingeridos, distribuidos en las tres comidas del día. En los últimos 4 días, la dosis de gluten se incrementó a 30 g, distribuidos de manera similar.

- Toma de muestra fecal:

Se recogieron las heces frescas de los 11 sujetos que intervinieron en el estudio bajo distintas condiciones de dieta: dieta normal, DSG, DSG+9 g de gluten y DSG+30 g de gluten. La toma de muestras se llevó a cabo antes de la DSG y después de cada una de las dietas ensayadas. Todas las muestras fueron homogeneizadas y alicuotadas en menos de 3 horas después de la defecación.

- La extracción de las prolaminas de las heces y solución de gliadina:

Prolaminas se extrajeron mediante la mezcla de 1 g de heces con 10 ml de etanol 60% (v/v) en un agitador rotatorio durante 1 h a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min y se separó el sobrenadante. El control positivo, gliadina PWG, se preparó, igualmente, en etanol 60% (v/v) a una concentración de 1 mg/ml.

En primer lugar, se realizó la toma de muestra de heces de los individuos analizados, los cuales mantenían una dieta normal en la que estaba presente el gluten (pan, pasta, galletas, etc.). La presencia de polipéptidos del gluten en los extractos fecales se determinó de manera semicuantitativa usando tiras inmunocromatográficas basadas en el anticuerpo G12, en diluciones seriadas de la muestra con el objetivo de representar un amplio rango desde menos de 6 ppm hasta más de 500 ppm. Las muestras fueron diluidas (1:10 a 1:20.000) en la solución de dilución propuesta por el fabricante (se probaron 6, 25, 50, 100, 250 y 500 ppm de gluten). Las tiras inmunocromatográficas se sumergieron en las distintas muestras (300 µL) durante 10 min y se dejaron secar al aire. En este caso, todos los individuos presentaron una excreción de proteínas/péptidos del gluten en heces con valores por encima de 500 ppm (**Figura 3A y 3B**).

Una vez confirmada la viabilidad del método para la detección del gluten en heces, estudiamos si existía una correlación entre la cantidad de gluten consumido y la cantidad de gluten excretado. Para ello, los 11 individuos fueron sometidos a una dieta controlada de gluten. En primer lugar, estos individuos consumieron una dieta estricta libre de gluten durante una semana; a continuación, se les administró 9 g de gluten al día repartidos en las comidas principales durante un periodo de 4 días (teniendo en cuenta el tiempo de llenado del intestino grueso) y por último, consumieron 30 g de gluten al día, igualmente repartidos en las comidas principales durante un periodo de 4 días. Con el fin de evitar diferencias en la determinación de gluten como consecuencia de la ingesta de diferentes productos con gluten de distinto origen, en todos los casos se les administró el mismo tipo (sin previo tratamiento térmico). El calendario propuesto tuvo en cuenta que en personas sanas el tiempo de tránsito es de 45 ± 16 horas (media \pm desviación estándar) con una dieta rica en fibra y más de 70 horas en dietas pobres en fibra (Stasse-Wolthuis y col., 1979, Am J Clin Nutr., 32:1881-1888).

Las muestras de heces recogidas durante el periodo en el que los individuos mantuvieron una dieta exenta de gluten presentaron, en todos los casos, niveles de

gluten por debajo del límite de detección del método (6 ppm gluten intacto, 10 ppm gluten hidrolizado). En cambio, cuando se realizó una ingesta de 9 g de gluten al día se encontró que la cantidad de gluten detectada estaba por encima de 250 ppm en todas las muestras, excepto en una de ellas que presentaba valores entre 6 y 25 ppm. Cuando los individuos consumieron 30 g de gluten al día los niveles excretados por encima de 500 ppm (**Figura 3A y 3B**), más de 1.000 veces superiores al límite de detección del método. Por tanto, existe una correlación entre la cantidad de gluten consumida y la cantidad de péptidos con epítomos G12 excretada a través de las heces.

Con el fin de demostrar la idoneidad del moAb G12 en la detección de péptidos/proteínas del gluten excretadas en las heces, los extractos proteicos obtenidos mediante tratamiento con etanol 60%, así como los controles, gliadina PWG y el gluten ingerido por los sujetos, fueron separados mediante SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas/péptidos fueron teñidas con tinción de plata o transferidas a una membrana y posterior análisis Western blot con el moAb G12 (**Figura 3C y 3D**). Los resultados indicaron que el moAb G12 reacciona con las muestras derivadas de una dieta convencional no controlada, DSG+9 g gluten y DSG+30 g gluten, así como también con el controles positivos, gliadina PWG y el gluten ingerido. Sin embargo, en la muestra derivada de una DSG no se encontraron péptidos/proteínas en heces (**Figura 3D**).

20 **Ejemplo 3. Monitorización *in vivo* de péptidos inmunotóxicos derivados del gluten en heces de individuos sometidos a una dieta controlada de gluten.**

En el presente ejemplo se muestra cómo se puede determinar por un método ELISA la digestión parcial de los péptidos reactivos con el anticuerpo usado en la invención, por el método más adecuado y ampliamente utilizado en el análisis clínico, al unir sencillez, sensibilidad y economía. En el caso de la detección de proteínas/péptidos del gluten, los sistemas ELISA tipo sándwich están diseñados para cuantificar proteínas intactas, pero pueden subestimar gluten hidrolizado. El paso del gluten por el tracto gastrointestinal da lugar a la hidrólisis de la mayor parte de este: un ELISA competitivo es capaz de cuantificar péptidos tóxicos, incluso a nivel de unos pocos aminoácidos, por

tanto sería un método conveniente para su cuantificación.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la concentración de péptidos tóxicos presentes en heces de individuos sanos mediante ELISA competitivo G12, usando como curva patrón el péptido 33-mer. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado en días separados. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS para Windows. Los datos se expresaron como media, máxima, mínima y valores de percentiles 25 y 75. Las diferencias entre los grupos fueron examinados mediante el test de Friedman y el test de Wilcoxon para comparar dos muestras relacionadas. La probabilidad estadística de $p < 0,05$ fue considerada significativa.

Al igual que en el ensayo anterior, las muestras de heces analizadas fueron las correspondientes a los periodos de ingesta: dieta no controlada, GSD, GSD+9 g y GSD+30 g. Las muestras de heces recogidas durante el periodo en el que los individuos mantuvieron una dieta exenta de gluten presentaron niveles de péptido tóxico inferiores al límite de cuantificación del método (5,4 pg 33-mer/mg muestra). Sin embargo, cuando se realizó una ingesta de 9 g de gluten al día en todos los casos se detectaron péptidos inmunoreactivos en heces, encontrándose en el rango de entre 3,49 y 9,62 ng de 33-mer/mg de heces, 600 veces superior al límite de detección del método. Por último, cuando los individuos consumieron 30 g de gluten al día los niveles de 33-mer obtenidos ascendieron en todos los casos, con respecto al periodo de ingesta de 9 g/día (6,69-28,00 ng de 33-mer/mg faeces, $p = 0,018$, con respecto a DSG+9 g) (**Figura 4**), más de 1.000 veces superior al límite de detección del método. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en la detección de gluten en heces mediante inmunocromatografía. El método basado en el anticuerpo anti-33-mer podría estimar la cantidad de proteínas del gluten consumidas mediante la medida de los péptidos reactivos excretados en las heces, además la ingestión de algunos gramos de gluten al día podrían detectarse en cantidades 600 veces superiores al límite de detección. Por lo tanto, una cantidad de ingesta superior a 10 mg de gluten al día podría ser asumida como detectable mediante ensayos inmunológicos basados en el mAb G12.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la monitorización del gluten ingerido mediante detección de péptidos inmunotóxicos en las heces caracterizado por el uso de métodos inmunológicos con anticuerpos que reconocen péptidos de proteínas del gluten con resistencia a la digestión gastrointestinal.
- 10 2.- Procedimiento para la monitorización del gluten según la reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos usan al menos un anticuerpo monoclonal con reactividad por algunas de las secuencias del péptido 33-mer, SEQ ID N° 5.
- 15 3.- Procedimiento para la monitorización de gluten en heces de las reivindicaciones 1 a 2 en el que los métodos inmunológicos usan al menos un anticuerpo monoclonal con capacidad para detectar los epítopos contenidos en el péptido 33-mer (SEQ ID N° 5), SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10.
- 20 4.- Procedimiento para la monitorización de gluten en heces de las reivindicaciones 1 a 3 en el que los métodos inmunológicos usan al menos uno de los anticuerpos monoclonales G12, A1 y R5.
- 25 5.- Procedimiento para la monitorización de gluten en heces de la reivindicaciones 1 a 4 en el que los métodos inmunológicos son un ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, inmunopartículas magnéticas, Western blot, biosensores electrónicos, biosensores de resonancia.
- 30 6.- Procedimiento de monitorización de la presencia de péptidos del gluten ingeridos según las reivindicaciones 1 a 5 en el que los métodos inmunológicos usan el anticuerpo monoclonal G12 conjugado a un enzima que permite un ensayo cuantitativo usando sustratos cromogénicos, fluorogénicos o luminiscentes.

- 5 7.- Procedimiento de monitorización de la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten ingerido mediante un ensayo inmunológico según algunas de las reivindicaciones del 1 a 6, caracterizado porque se usa como patrón de referencia algunos de los péptidos de la reivindicación 3.
- 10 8.- Procedimiento de monitorización de la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten ingerido mediante un ensayo inmunológico según alguna de las reivindicaciones del 1 a 6, caracterizado porque se usa como patrón de referencia gliadina hidrolizada con pepsina y tripsina.
- 15 9.- Procedimiento de monitorización en heces de la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten ingerido mediante un ensayo en el que los métodos inmunológicos usan al menos uno de los anticuerpos anti gliadina G12 y A1 para la realización de un ensayo semicuantitativo basado en tiras inmunocromatográficas de detección rápida.
- 20 10.- Uso de procedimientos analíticos según alguna de las reivindicaciones 1 a 9 para la monitorización del cumplimiento de la dieta sin gluten.
- 25 11.- Uso de procedimientos analíticos según alguna de las reivindicaciones 1 a 9 para detectar la ingesta no controlada de gluten en pacientes celíacos sometidos a dieta sin gluten pero con síntomas refractarios y agudos de la enfermedad celíaca.
- 30 12.- Uso de procedimientos analíticos según alguna de las reivindicaciones 1 a 9 para monitorizar la efectividad de las terapias relacionadas con la eliminación de péptidos inmunogénicos del gluten.
- 35 13.- Kit analítico para detectar péptidos inmunogénicos del gluten en heces que comprendan:
- Una solución dedicada a la extracción del gluten en heces.
 - Un patrón de referencia peptídico que comprenda al menos una parte o la totalidad del péptido inmunogénico del 33-mer de gliadina.
 - Un ensayo inmunológico que usen algún anticuerpo reactivo con el péptido 33-mer de gliadina.

14.- Kit analítico para detectar péptidos inmunogénicos del gluten en heces de la reivindicación 13 que comprenda:

- 5
- Una solución acuosa que tenga en su composición alguno de los componentes siguientes: un agente dispersante, un detergente suave, un agente reductor, un tampón, y etanol.
 - Un patrón de referencia peptídico obtenido por hidrólisis pepsino-tripsinada de gliadina o un péptido sintético que comprenda parte o la totalidad de la
- 10
- Un ensayo inmunológico que usen algún anticuerpo reactivo con el péptido 33-mer de gliadina del tipo ELISA, tiras inmunocromatográficas, inmunoblots, biosensores electrónicos.

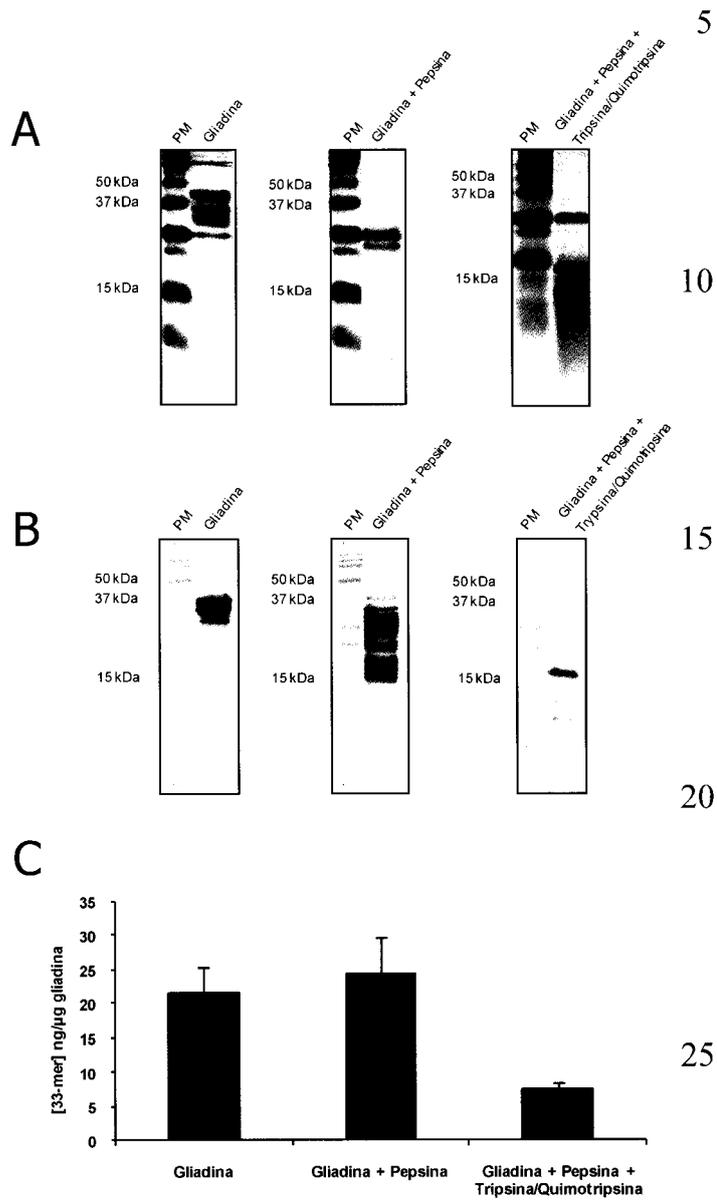


Figura 1

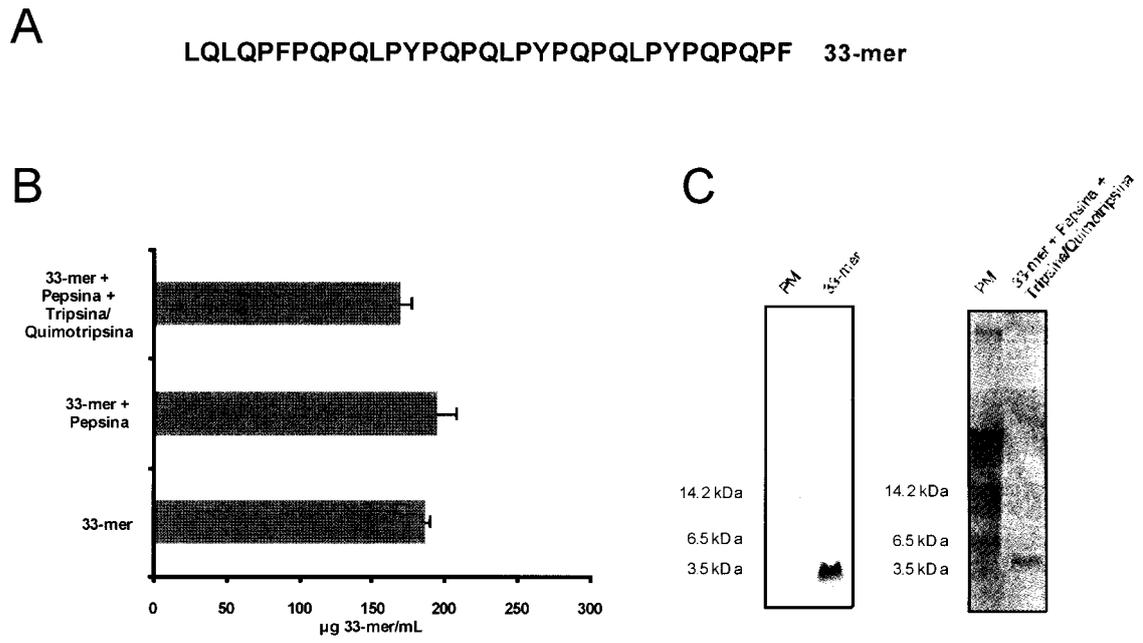
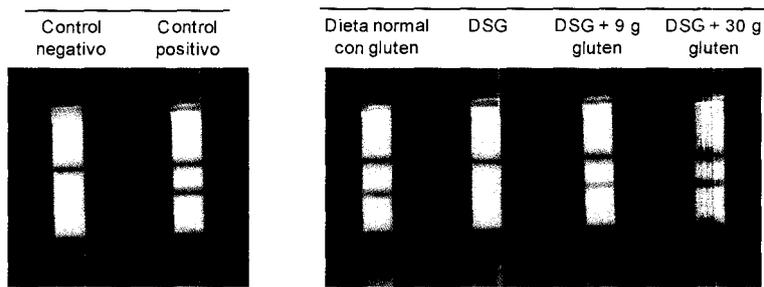


Figura 2

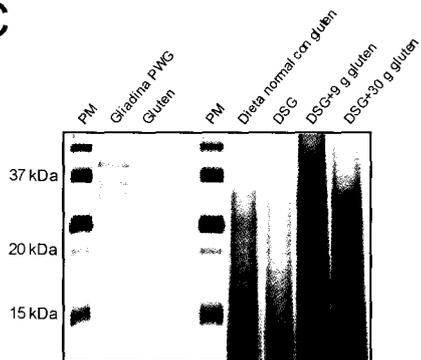
A

Dieta	HL901	HL902	HL903	HL904	HL905	HL906	HL907	HL908	HL909	HL910	HL911
Normal dieta gluten	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
DSG	<6	<6	<6*	<6	<6	<6*	<6	<6	<6	<6	<6
DSG + 9 g gluten	>500	>500	>500	>500	250-500	250-500	>500	>500	6-25	>500	>500
DSG + 30 g gluten	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

B



C



D

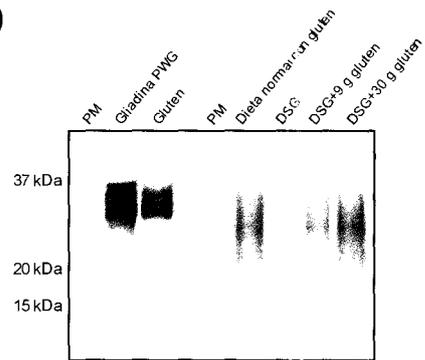


Figura 3

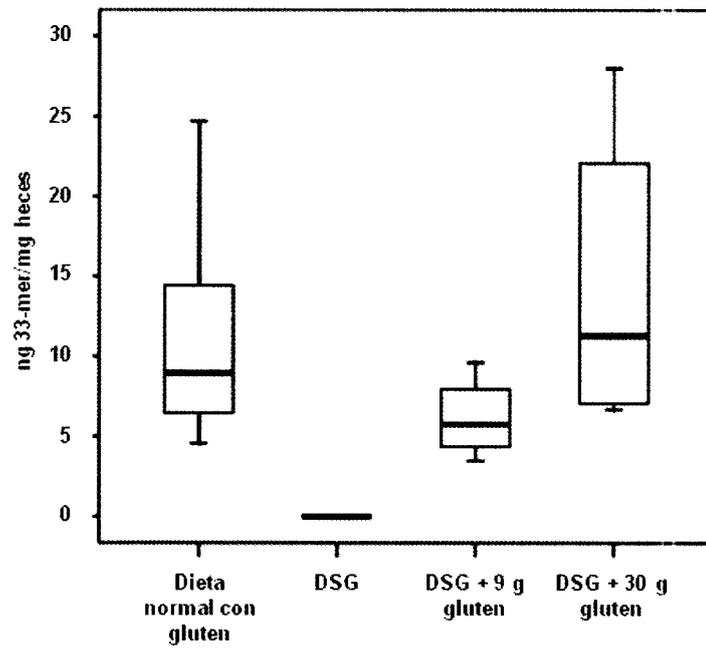


Figura 4

Lista de secuencias

<110> C. Sousa, I. Comino, A. Real, S. Vivas, A. Cebolla.

<120> Determinación de niveles de péptidos inmunogénicos del gluten en muestras humanas.

5

<160> 11

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> *Triticum* sp.

10

<400> Gln Pro Gln Lys Pro Tyr

1 5

<210> 2

<211> 6

15

<212> PRT

<213> *Triticum* sp.

<400> Gln Pro Glu Lys Pro Tyr

1 5

20

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> *Hordeum* sp.

<400> Gln Pro Gln Lys Pro Phe

25

1 5

<210> 4

<211> 6

30

<212> PRT

<213> *Hordeum* sp.

<400> Gln Pro Glu Lys Pro Phe

1 5

35

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> *Triticum* sp.

<400> Lys Gln Lys Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro

40

1 5 10 15

Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Lys Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe

20

25

30

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
5 <400> Gln Pro Gln Lys Pro Lys
 1 5

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

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
20 <213> *Hordeum* sp.; *Secale* sp.
 <400> Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro
 1 5

<210> 9
25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Hordeum* sp.
 <400> Gln Lys Pro Phe Pro Gln Pro
 1 5

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
30 <400> Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5

<210> 11
 <211> 5
35 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
 <400> Gln Gln Pro Phe Pro
 1 5

<210> 11
 <211> 5
40 <212> PRT
 <213> *Triticum* sp.
 <400> Gln Gln Pro Phe Pro
 1 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001633

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	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. Página 1.	9
Y	WO 2004016065 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. OPERON, S.A.) 26.02.2004	9
A	JURJUS ABDO R., et al. Diagnostic markers for celiac disease in blood and body fluids. 2005. <i>FASEB Journal</i> . Vol. 19, 5, Suppl. S, Part 2, A1068.	1-14
A	WO 2010085387 A2 (DODDS, W.) 29.07.2010	1-14
A	SHAN L., et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. 2002. <i>Science</i> . Vol. 297 páginas 2275-2279.	1-14

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
26.06.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8, 10-14	SI
	Reivindicaciones 9	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. 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. Página 1.	2008
D02	WO 2004016065 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. OPERON, S.A.)	26.02.2004
D03	JURJUS ABDO R., et al. Diagnostic markers for celiac disease in blood and body fluids. <i>FASEB Journal</i> . Vol. 19, 5, Suppl. S, Part 2, A1068.	2005
D04	WO 2010085387 A2 (DODDS, W.)	29.07.2010
D05	SHAN L., et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. <i>Science</i> . Vol. 297 páginas 2275-2279.	2002

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

NOVEDAD Y ACTIVIDAD (Artículos 6 y 8 Ley11/1986)

En las reivindicaciones 1-8 y 10-12 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento para la monitorización del gluten ingerido mediante detección de péptidos inmunotóxicos en las heces caracterizado por el uso de métodos inmunológicos con anticuerpos que reconocen péptidos de proteínas del gluten con resistencia a la digestión gastrointestinal. También se reivindica en la solicitud de patente, en las reivindicaciones 13 y 14, un kit analítico para detectar péptidos inmunogénicos del gluten en heces.

En la reivindicación 9 se reivindica un procedimiento para la monitorización de la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten ingerido mediante un ensayo inmunológico en el que los métodos inmunológicos usan al menos uno de los anticuerpos anti gliadina G12 y A1 para la realización de un ensayo semicuantitativo basado en tiras inmunocromatográficas de detección rápida

El documento D01 muestra (en la página 1) como el anticuerpo A1 resulta útil para detectar en alimentos, péptidos del gluten que son tóxicos para los enfermos celíacos.

El documento D02 divulga un procedimiento inmunocromatográfico para su uso en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.

El documento D03 refleja un método para la monitorización de la enfermedad celíaca.

El documento D04 divulga un método inmunológico para detectar intolerancia al gluten.

El documento D05 muestra como el péptido 33-mer de la gliadina, responsable de la toxicidad del gluten, es resistente a la digestión gastrointestinal.

El documento D01 muestra (en la página 1) como el anticuerpo A1 resulta útil para detectar en alimentos, péptidos del gluten que son tóxicos para los enfermos celíacos. Por lo que, de este modo se podría analizar la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten ingerido, tal y como está reivindicado en la reivindicación 9, partiendo de la muestra alimenticia de la que procedía dicha ingesta de gluten. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 9 se realiza empleando tiras inmunocromatográficas de detección rápida. El uso de un sistema inmunocromatográfico en el procedimiento reivindicado, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia, tal y como se muestra en el documento D02. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documento D01 y D02 la reivindicación 9 presenta novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 Ley 11/1986.

En ninguno de los documentos citados se divulga un procedimiento para la monitorización del gluten ingerido mediante detección de péptidos inmunotóxicos en las heces caracterizado por el uso de métodos inmunológicos con anticuerpos que reconocen péptidos de proteínas del gluten con resistencia a la digestión gastrointestinal. Teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01, D02, D03, D04 y D05, la existencia de una correlación entre el gluten ingerido y los péptidos inmunotóxicos presentes en las heces no derivaría de manera evidente para un experto en la materia. Por tanto, las reivindicaciones 1-8, 10-12, 13 y 14 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 Ley 11/1986.