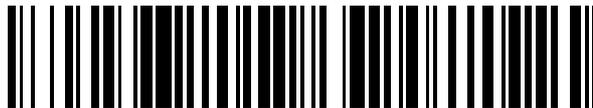


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 653**

21 Número de solicitud: 201430567

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

16.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.10.2015

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN
CARLOS (100.0%)
C/ PROFESOR MARTÍN LAGOS, S/N
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**NÚÑEZ PARDO DE VERA, M^a Concepción;
BODAS PINEDO, Andrés;
LÓPEZ PALACIOS, Natalia y
DIELI CRIMI, Romina**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO Y KIT PARA EL DIAGNÓSTICO DE CELIAQUÍA**

57 Resumen:

Método y kit para el diagnóstico de celiaquía.

La presente invención se refiere a métodos y kits para el diagnóstico de la enfermedad celíaca mediante la combinación mediante un único kit de la detección de marcadores serológicos y genéticos. La presente invención pone de manifiesto que la presencia de anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y la ausencia de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o -DQ8, puede indicar la presencia de la enfermedad.

ES 2 548 653 A2

MÉTODO Y KIT PARA EL DIAGNÓSTICO DE CELIAQUÍA

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a métodos y kits para el diagnóstico y/o seguimiento de la enfermedad celíaca. Por lo tanto la presente invención se engloba dentro del campo técnico de la medicina, específicamente en el campo técnico del diagnóstico clínico y más específicamente en el diagnóstico de pacientes que padecen celiacía.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad celíaca (EC) afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, aunque existen diferencias dependiendo de las poblaciones. En España se estima que su frecuencia oscila entre 1/71 en la población infantil y 1/357 en la población adulta.

15 Además, la frecuencia de la enfermedad es mayor en familiares de pacientes celíacos e individuos con determinadas patologías, como diabetes mellitus tipo I, tiroiditis autoinmune, deficiencia de IgA, síndrome de Down, síndrome de Turner o síndrome de Williams, los cuales constituyen los grupos de riesgo.

20 La enfermedad celíaca es una enfermedad crónica, por tanto la falta de diagnóstico implica la visita reiterada de estos pacientes a las consultas hospitalarias, principalmente a las consultas de Pediatría y Digestivo, pero también pueden acudir simultáneamente a diversos especialistas puesto que la sintomatología clínica es a menudo inespecífica, sobre todo en individuos adultos. Si consideramos que esta
25 enfermedad afecta a un elevado número de niños, el coste sanitario que pueden ocasionar a lo largo de su vida es muy elevado. Hay que tener en cuenta que la enfermedad celíaca tiene un tratamiento que resulta eficaz en la gran mayoría de los casos y consiste en eliminar el gluten de la dieta, por lo cual una vez diagnosticados ya no suponen un coste sanitario, salvo por los controles de seguimiento que puedan
30 necesitar.

En 2012, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) propuso unas nuevas guías para el diagnóstico de la enfermedad celíaca en niños y adolescentes (Husby S, *et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-60). La definición de la enfermedad también se revisó y la EC pasó a ser considerada un trastorno sistémico, debido a su gran variabilidad de

manifestaciones clínicas, muchas de ellas extra-intestinales. Esta variabilidad clínica implica la necesidad de unas herramientas de diagnóstico altamente específicas y sensibles.

5 En la actualidad el diagnóstico de la enfermedad celíaca implica en la gran mayoría de los casos la realización de tres tipos de pruebas. Dos de ellas (pruebas serológicas y genéticas) están encaminadas a seleccionar al grupo de individuos que pueden padecer la enfermedad y que por tanto requieren la realización de la tercera prueba (biopsia duodenal), que es la que ofrece el diagnóstico definitivo. Sin embargo, dada la
10 agresividad de dicha prueba, los *tests* serológicos y genéticos se emplean como pruebas de cribado previas, de manera que con resultados negativos en estas pruebas se puede llegar a descartar el diagnóstico de enfermedad celíaca sin la realización de la biopsia intestinal. Las pruebas diagnósticas se llevan a cabo por diferentes técnicas y requieren diferentes aparatos y/o ensayos comerciales. A pesar de que actualmente
15 existen algoritmos diagnósticos basados en los resultados de estas pruebas, se considera que sólo una pequeña parte de los pacientes son diagnosticados correctamente. El diagnóstico de la enfermedad tiene una repercusión inmediata en el paciente puesto que tras el inicio del tratamiento (dieta sin gluten) cesan los síntomas y el paciente recupera una vida normal en la gran mayoría de los casos.

20 En este sentido, la presencia de anticuerpos específicos frente a transglutaminasa tisular tipo 2 (TG2), frente a endomisio (EMA) y frente a péptidos deamidados de gliadina (PDG), detectados mediante kits específicos para ello, junto con la presencia de los haplotipos HLA (antígenos de leucocitos humanos) -DQ2 o -DQ8, detectados
25 mediante sondas y *primers* específicos detectados de manera independiente de los marcadores serológicos, definen al grupo de pacientes que padece EC, cuando coexiste con una combinación variable de manifestaciones clínicas y enteropatía dependientes de gluten. En la práctica clínica habitual, existe una elevada disponibilidad de *tests* serológicos para el diagnóstico de EC. Sin embargo, la
30 sensibilidad y especificidad de los mismos se basa principalmente en los anticuerpos concretos que comprenden dichos kits, así como en el propio kit comercial empleado para dicho diagnóstico. Así, es conocido que los anticuerpos anti-TG2 y anti-EMA, ambos dirigidos frente al enzima TG2, son los más específicos para el diagnóstico de EC. La especificidad de los anti-EMA es superior, pero puesto que su determinación
35 se lleva a cabo por inmunofluorescencia indirecta, la cual es una técnica laboriosa y subjetiva de interpretar por personal no experto, en la práctica clínica habitual, se

recomienda testar en primer lugar la presencia de anticuerpos anti-TG2 y, a continuación, confirmar los resultados positivos para la presencia de anticuerpos anti-EMA. Además, también se utiliza la determinación de anticuerpos anti-PDG. La correlación de anticuerpos anti-TG2 y EMA es muy alta, pero puede disminuir cuando se emplean kits comerciales que detectan neoepítomos que emergen tras la reacción de entrecruzamiento entre TG2 y PDG. Entre los kits comerciales capaces de detectar los neoepítomos destacan, el kit Aeskulisa® tTg-A (Aesku.Diagnostics, Wendelsheim, Alemania), el kit Aeskulisa® CeliCheck (Aesku.Diagnostics, Wendelshiem, Germany) y el kit Quanta Lite® tTG-DGP screen (Inova Diagnostics, Inc, CA, USA).

Por otro lado, en la actualidad se considera que la práctica totalidad de enfermos celíacos presentan los alelos que codifican las moléculas HLA-DQ2 o -DQ8. Además, dependiendo del número de alelos y de qué alelos precisos estén presentes en los sujetos, el riesgo de padecer la enfermedad varía. En este sentido, la ausencia de los alelos que codifican HLA-DQ2 o -DQ8 excluye o hace muy poco posible la presencia de EC. La molécula DQ2 está codificada por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*05* y *DQB1*02* y la molécula DQ8 por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*. Además, se cree que el alelo *DQB1*02* presente de forma aislada también confiere riesgo, aunque bajo. La ausencia de esos alelos, en las combinaciones descritas, prácticamente descarta la enfermedad.

El uso de kits comerciales para la detección de los marcadores serológicos que incluyen la detección de neoepítomos que surgen tras la unión TG2-PDG, pone de manifiesto que existen casos de individuos que son positivos para estos marcadores y negativos para anti-EMA (no presentan anticuerpos frente a EMA), por lo que siguiendo los actuales criterios diagnósticos se consideraría que no presentan celiaquía y que su dolencia sería debida a otra patología diferente. Sin embargo, los inventores ponen de manifiesto que existen casos de sujetos que padecen EC dentro de este grupo de pacientes (TG2+ y EMA-), pero que son diagnosticados, a priori, como sujetos que no padecen la enfermedad, es decir, muchos de ellos se diagnostican erróneamente, ya que de hecho, sí que padecen la enfermedad. Además, los inventores también ponen de manifiesto que algunos enfermos que presentan anticuerpos detectados mediante el kit comercial Aeskulisa® tTg-A, que detecta la formación de neoepítomos, pero carecen de anticuerpos anti-EMA, muestran unas características genéticas particulares que no se adecúan a las comúnmente presentes en los enfermos que padecen celiaquía, es decir, no presentan los marcadores

genéticos, HLA-DQ2 o HLA-DQ8, ya que un 33% de dichos pacientes carecen de moléculas HLA-DQ2/DQ8 completas, es decir, presentan sólo uno o ninguno de los alelos necesarios para la formación de dichas moléculas.

5 Por lo tanto, teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, existe un grupo de
pacientes celíacos que, a día de hoy, utilizando las guías diagnósticas y la mayoría de
los métodos o kits comerciales existentes en el mercado, tienen muy complicado
recibir un correcto diagnóstico ya que no presentan los criterios comúnmente
10 establecidos para el diagnóstico de la enfermedad mediante las pruebas serológicas
(anti-TG2 y anti-EMA) y genéticas (HLA-DQ2 o -DQ8). Especialmente, hay que tener
en cuenta que la ausencia de anticuerpos frente a EMA se considera bastante
indicativo de la ausencia de la enfermedad celíaca. Además, los principales alelos de
riesgo genético que codifican para HLA-DQ2 o HLA-DQ8, no aparecen a la misma
15 frecuencia de la científicamente reconocida como característica para los enfermos que
padecen celiaquía, lo cual contribuye a dificultar más el diagnóstico de estos pacientes
y hace más necesario el desarrollo de herramientas precisas, con una alta
especificidad y sensibilidad, que permitan el correcto y rápido diagnóstico de la
enfermedad. En este sentido, existe en el estado de la técnica una importante
necesidad para el desarrollo de herramientas precisas y fiables para el diagnóstico de
20 la enfermedad celíaca, específicamente para el diagnóstico de aquellos pacientes que
presentan características serológicas y genéticas poco frecuentes que escapan de los
actuales criterios diagnósticos, de manera que por un lado dichos individuos sean
correctamente diagnosticados y por otro lado que se reduzca el tiempo que transcurre
desde que un individuo empieza a padecer los síntomas de la enfermedad (debut)
25 hasta que se le diagnostique correctamente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30 Con el objetivo de superar los problemas existentes en el estado de la técnica para el
correcto diagnóstico de pacientes que padecen celiaquía, la presente invención
describe un método de obtención de datos útiles, así como un método de diagnóstico
in vitro, de pacientes que padecen celiaquía y que incluye a aquellos pacientes que no
presentan las características serológicas y genéticas típicas que se describen en las
guías clínicas para el diagnóstico de dicha enfermedad y que por lo tanto escapan de
35 los actuales criterios diagnósticos.

El término "celiaquía" o "enfermedad celíaca" en la presente invención hace referencia a una patología mediada por el sistema inmunitario caracterizada por una inflamación crónica del intestino delgado causada por la exposición al gluten. La enfermedad celíaca supone una intolerancia permanente al gluten. El gluten hace referencia a proteínas presentes en cereales tales como trigo (*Triticum spp*), cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*) y posiblemente avena (*Avena spp*). En el sujeto que padece la celiacía o celíaco, tras la ingestión de gluten el enzima transglutaminasa tisular o transglutaminasa tipo 2 (TG2) modifica dichas proteínas y se desencadena una respuesta mediada por el sistema inmunitario que conduce a una lesión histológica intestinal caracterizada en la gran mayoría de los casos por atrofia de las vellosidades que recubren el intestino e interferencia en la absorción de nutrientes.

El desarrollo de la enfermedad celíaca está determinado tanto por factores ambientales (alimentación) como genéticos. Así, la celiacía implica también una predisposición genética ya que la mayor parte de celíacos presentan el antígeno de leucocito humano (HLA) de tipo DQ2 (HLA-DQ2) o DQ8 (HLA-DQ8) (Tjon JM. et al. 2010 *Immunogenetics* 62:641-651).

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles, a partir de aquí lo denominaremos primer método de la invención, para el diagnóstico de celiacía en una muestra biológica aislada de un sujeto que comprende la detección y/o cuantificación conjunta de marcadores serológicos y genéticos, donde los marcadores serológicos se seleccionan entre: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 (TG2), anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina (PDG) y anticuerpos frente a neoepítos que surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y donde el marcador genético es HLA-DQ.

A efectos de la presente invención, la transglutaminasa 2 (TG2) humana se define tal y como es recogida en la base de datos NCBI con número de acceso AAT79353.1 (según la versión 4 de Agosto de 2004 de dicha base de datos), codificada por el gen transglutaminasa 2 tal y como se recoge en la base de datos NCBI con número de acceso ID 7052 (revisado el 8 de Abril de 2014 en dicha base de datos). La TG2 es la responsable de la deamidación selectiva de gluten, que a su vez, provoca la

generación de una serie de péptidos de gluten que se unen a moléculas HLA-DQ2 o -DQ8 con alta afinidad.

5 A efectos de la presente invención los PDG se definen como fragmentos de gluten que han sufrido deamidación por la TG2 humana una vez ingeridos en la dieta.

10 A efectos de la presente invención, el término “neoepítipo” hace referencia a aquellos epítipos nuevos que surgen tras la unión covalente entre péptidos de gliadina y la TG2 como consecuencia de una reacción de transamidación catalizada por la propia TG2. El término anticuerpos anti-péptidos deamidados de gliadina hace referencia a aquellos anticuerpos que se forman frente a fragmentos de gluten que han sufrido deamidación por el enzima TG2.

15 A efectos de la presente invención el término “HLA” o “antígeno leucocitario humano” o “antígeno de leucocitos humanos”, se refiere a un segmento de aproximadamente 4 Mb localizado en el brazo corto del cromosoma 6 humano (6p21). La región HLA comprende gran cantidad de genes, entre los que destacan los que se clasifican en la clase I HLA y en la clase II, que presentan antígenos a subtipos diferentes de células. Las moléculas de clase II, entre las que se encuentran HLA-DR y HLA-DQ, son
20 glicoproteínas heterodiméricas que consisten en una cadena alfa y una cadena beta. Las moléculas MHC de clase II se expresan en la superficie celular de las células dendríticas, los macrófagos, células B y otros tipos celulares involucrados en la presentación de antígenos a las células T que expresan la glicoproteína de superficie celular CD4.

25

A efectos de la presente invención el término “HLA-DQ” se refiere a la glicoproteína heterodimérica que se expresa en ciertos tipos celulares y que consta de una cadena alfa codificada por el gen *HLA-DQA1* y de una cadena beta codificada por el gen *HLA-DQB1*. La proteína HLA-DQA1 se define tal como es recogida en la base de datos
30 NCBI con número de acceso AAH08585 (según la versión del 3 de octubre de 2003 de dicha base de datos) y con número de acceso AAH73977 (según la versión del 27 de julio de 2004 de dicha base de datos); codificada por el gen *HLA-DQA1*, tal y como se recoge en la base de datos NCBI con número de acceso ID 3117 (revisado el 8 de abril de 2014 en dicha base de datos). La proteína HLA-DQB1 se define tal como es
35 recogida en la base de datos NCBI con número de acceso AAB60325 (según la versión del 25 de mayo de 1994 de dicha base de datos) y con número de acceso

P01920.2 (según la versión de 19 de marzo de 2014 de dicha base de datos); codificada por el gen *HLA-DQB1*, tal y como se recoge en la base de datos NCBI con número de acceso ID 3119 (revisado el 8 de Abril de 2014 en dicha base de datos).

5 A efectos de la presente invención, se entiende por riesgo genético, el riesgo que presenta un sujeto de padecer celiacía dependiendo de los alelos específicos *DQA1* y/o *DQB1* que presente, así como si presenta una o dos copias de los mismos.

10 A efectos de la presente invención el término "HLA-DQ2" se refiere a la glicoproteína heterodimérica que se expresa en ciertos tipos celulares de individuos que presentan los alelos *DQA1*05* y *DQB1*02*. En la presente invención el alelo *DQA1*05* engloba los alelos *DQA1*05:01* y *DQA1*05:05*; y el alelo *DQB1*02* engloba los alelos *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*. Así, como se entiende en la presente invención, un sujeto
15 presenta el marcador HLA-DQ2 cuando expresa al menos uno de los alelos *DQA1*05:01* o *DQA1*05:05* junto con al menos uno de los alelos *DQB1*02:01* o *DQB1*02:02*.

A efectos de la presente invención, el término "HLA-DQ8" se refiere a la glicoproteína heterodimérica que se expresa en ciertos tipos celulares de individuos que presentan
20 los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*. En la presente invención el alelo *DQA1*03* engloba los alelos *DQA1*03:01* y *DQA1*03:02*. Así, como se entiende en la presente invención, un sujeto presenta el marcador HLA-DQ8 cuando expresa al menos uno de los alelos *DQA1*03:01* o *DQA1*03:02* junto con el alelo *DQB1*03:02*.

25 El término "alelo" se refiere a una de las dos o más formas alternativas de un gen, difiriendo en la secuencia genética y que se encuentran en el mismo lugar en un cromosoma.

30 Así en una realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

35 Así, en otra realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que el marcador HLA-DQ2, está codificado por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*05* y *DQB1*02*. En una realización más preferida aún, el alelo *DQA1*05* se selecciona entre las variantes *DQA1*05:01* y *DQA1*05:05* y el alelo *DQB1*02* se selecciona entre las variantes *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.

En otra realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*05:01* o *DQA1*05:05* junto con al menos uno de los alelos *DQB1*02:01* o *DQB1*02:02*.

5

En otra realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*. En una realización más preferida aún, el alelo *DQA1*03* se selecciona entre: *DQA1*03:01* y *DQA1*03:02*.

10

En otra realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*03:01* o *DQA1*03:02* junto con la presencia del alelo *DQB1*03:02*.

15

En otra realización preferida, el primer método de la invención se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y la ausencia de los alelos que codifican para los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.

20

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

25

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

30

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta bajo riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que

35

surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y cualquier combinación de alelos en *DQA1* y *DQB1*, diferente a las combinaciones descritas para los grupos de riesgo genético alto y moderado.

5 En una realización más preferida aún del grupo de pacientes clasificados como de bajo riesgo genético, éstos se caracterizan por que dichos sujetos tienen mayor riesgo genético de padecer celiacía si presentan el alelo *DQA1*05* en ausencia del alelo *DQB1*02* que si presentan cualquier otra combinación posible de alelos dentro de la categoría de bajo riesgo genético.

10

En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y la presencia de al menos uno de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiacía.

15

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético muy alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

20

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

25

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.

30

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.

35

En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y la presencia de al menos uno de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.

5

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta muy alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

10

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

15

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.

20

En una realización más preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.

25

En una realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que comprende además la detección y/o cuantificación de al menos un marcador de atrofia intestinal, preferentemente la detección del marcador REG1A (*regenerating islet-derived 1 alpha*).

30

Dicha proteína REG1A se define tal y como se recoge en la base de datos del NCBI con número de acceso AAH05350 (según la versión del 9 de junio de 2008 de dicha base de datos), y que está codificada por el gen *REG1A* tal y como se recoge en la base de datos del NCBI con número de acceso ID 5967 (revisado el 8 de Abril de 2014 en dicha base de datos).

35

En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG).

5 El término "anticuerpo", tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". En el contexto de la presente invención, los anticuerpos son anticuerpos anti-TG2, anti-PDG y anti-TG2-PDG, es decir, que reconocen y se unen de modo específico a TG2, PDG y a los neoepítomos que puedan surgir de la unión TG2-PDG, respectivamente, siendo dichas proteínas, o fragmentos
10 de las mismas, los antígenos.

Así, en el contexto de la presente invención se utiliza cualquier anticuerpo capaz de detectar la presencia de anticuerpos anti-TG2, anti-PDG y anti-neoepítomos que puedan surgir de la unión TG2-PDG. Anticuerpos conocidos para la detección de anti-
15 TG2, anti-PDG y anti-neoepítomos que puedan surgir de la unión y/o el entrecruzamiento entre TG2-PDG, son por ejemplo, sin carácter limitativo, cualquier anticuerpo diseñado por un grupo de investigación o un anticuerpo comercial que se puede adquirir en las casas comerciales: R&D System, Cell Signaling Technology, Origene, GenScript, Abcam, Cloud Clone Corporation, LS Bio, entre otras.

20 En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de los marcadores serológicos se realiza mediante un inmunoensayo y la detección de los marcadores genéticos mediante la técnica PCR, preferentemente, mediante la técnica PCR-SSOP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia) o PCR-SSO (Reacción en Cadena de la
25 Polimerasa-oligonucleótidos específicos de secuencia).

El término "inmunoensayo", tal como aquí se utiliza, incluye cualquier técnica basada en la formación o empleo de inmunocomplejos, es decir, complejos resultantes de la
30 unión de anticuerpos y antígenos, como referencia de cuantificación de un analito (sustancia objeto de análisis) determinado, que puede ser el anticuerpo o un antígeno, usando para la medición una molécula como marcador que produce una señal detectable en respuesta a una unión específica. Dicho término incluye tanto inmunoensayos competitivos como no competitivos, así como inmunoensayos
35 heterogéneos y homogéneos.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores incluyen elementos radiactivos (e.g., azufre, yodo, etc.); enzimas (e.g., peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, etc.); compuestos o colorantes fluorescentes (e.g., fluoresceína, rodamina, etc.), fosforescentes o quimioluminiscentes (e.g., dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc.); partículas de látex o magnéticas; partículas coloidales de oro, plata, o selenio; quelatos metálicos; coenzimas; etc. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales. Así, el complejo formado puede ser detectado o visualizado por cualquier técnica apropiada, dependiendo del marcador elegido, conocida por los técnicos en la materia, utilizando los dispositivos apropiados, por ejemplo, mediante técnicas basadas en métodos radiactivos, colorimétricos, fluorimétricos, (quimio)luminiscentes, etc., todas ellas conocidas por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, cuando el marcador es una enzima, la detección del complejo (antígeno-anticuerpo)/marcador puede llevarse a cabo poniendo en contacto dicho complejo con un sustrato apropiado y, opcionalmente, con los activadores y/o agentes de amplificación enzimáticos apropiados.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inmunoensayos adecuados para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención incluyen Western blot, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich-ELISA"), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DELFIA (fluoroimmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos), FPIA (inmunoensayo de polarización fluorescente), CMIA (inmunoensayo magnético quimioluminiscente), RIA (radioinmunoensayo heterogéneo y competitivo), IRMA (radioinmunoensayo heterogéneo y no competitivo), MEIA (inmunoensayo por micropartícula), luminoimmunoensayos, técnicas inmunocitoquímicas e inmuno-histoquímicas, técnicas basadas en el uso de esferas, nanopartículas, biochips de biomarcadores, biosensores (e.g., inmunobiosensores) o microarrays, lab-on-a-chip que incluyen anticuerpos específicos, ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los "dipsticks", etc.

Como se ha mencionado previamente, la detección de los marcadores genéticos se realiza mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferentemente mediante las técnicas PCR-SSOP (Reacción en Cadena de la

Polimerasa-sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia) o PCR-SSO (Reacción en Cadena de la Polimerasa-oligonucleótidos específicos de secuencia).

5 En una realización más preferida aún del primer método de la invención, la determinación conjunta de los marcadores serológicos y genéticos se lleva a cabo mediante la tecnología Luminex (Tepnel Lifecodes Corp, Stamford, CT EEUU), utilizando anticuerpos específicos para la detección de los anticuerpos anti-TG2, anti-PDG y anti-TG2-PDG y utilizando sondas u oligonucleótidos específicos para la detección de los alelos *DQA1*05:01*, *DQA1*05:05*, *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02* para
10 caracterizar la presencia del marcador HLA-DQ2 y sondas u oligonucleótidos específicos para la detección de los alelos *DQA1*03:01*, *DQA1*03:02* y *DQB1*03:02* para caracterizar la presencia del marcador HLA-DQ8.

15 El sistema Luminex se basa en la combinación de tres tecnologías: el uso de microesferas marcadas con fluorocromos, las cuales actúan como identificadoras y como superficie sólida para desarrollar el ensayo; un instrumento basado en la citometría de flujo y que integra distintos componentes (láseres, óptica, fluidos avanzados ...); y un software diseñado para la adquisición de datos y análisis. Este sistema permite llevar a cabo distintas determinaciones en un solo pocillo mediante el
20 empleo de microesferas identificadas por la distinta proporción de más de un fluorocromo, preferentemente dos fluorocromos y más preferentemente, más de dos fluorocromos, que permitirá identificarlas de manera aislada tras ser excitadas por el láser del equipo de análisis. En dicha técnica, se unen a la superficie de las esferas las moléculas correspondientes que permitan capturar los analitos de interés, en este
25 caso los antígenos que detecten los anticuerpos objeto de estudio, las sondas oligonucleotídicas que detecten los alelos presentes en *DQA1* y *DQB1*, o los anticuerpos dirigidos frente a otras moléculas de interés, preferentemente frente a marcadores de atrofia intestinal. Mediante el uso de sondas o anticuerpos secundarios marcados con una molécula capaz de emitir fluorescencia, como por ejemplo, sin
30 limitar, ficoeritrina, podemos detectar por medio de un segundo láser, si la muestra contiene el analito buscado (análisis cualitativo), e incluso en el caso de la detección de anticuerpos o antígenos proteicos qué cantidad (análisis cuantitativo).

35 La tecnología Luminex permite analizar multitud de proteínas o secuencias nucleotídicas para ser detectadas en cada pocillo de una placa de 96 o 384 pocillos, utilizando un volumen de muestra muy pequeño. En la presente invención, la

tecnología Luminex se aplicará mediante el anclaje de los antígenos que detecten la presencia de los anticuerpos anti-TG2, anti-PDG o ambos, a la superficie de microesferas, así como mediante el anclaje de las sondas oligonucleotídicas que detecten los alelos en *DQA1* y *DQB1*, a la superficie de las microesferas. También podrá considerarse el anclaje de anticuerpos frente a proteínas específicas a la superficie de las microesferas. Dichas proteínas específicas pueden ser por ejemplo, pero sin limitación, marcadores de atrofia intestinal, como por ejemplo la proteína REG1A. Las microesferas estarán marcadas con diferentes fluorocromos, de forma que se establece un ratio de los fluorocromos en cada una de ellas, la combinación de los fluorocromos en distintas proporciones les confiere una coloración diferente en función de la cantidad que posean de cada fluorocromo. Este procedimiento permite la creación de un elevado número de poblaciones distintas de fluoroesferas, y por tanto, la presencia de un número elevado de sondas diferentes para la hibridación, una por cada tipo de microesfera. El espectro de emisión de cada microesfera es único, lo que posibilita la identificación simultánea de todas ellas y por tanto, de la reacción o ensayo que se está llevando a cabo en la superficie de cada una de ellas. Posteriormente, las microesferas son obligadas a pasar por una corriente de flujo. Cada una de ellas es clasificada de acuerdo al ratio de su marcaje fluorescente interno. En una realización particular, las proteínas o péptidos TG2, PDG o ambos se utilizan como antígenos de soporte, en una fase sólida, ancladas a la superficie de las microesferas. En otra realización particular, las sondas complementarias que detectan los alelos en *DQA1* y *DQB1* se anclan a la superficie de las microesferas. En otra realización particular, se pueden anclar a la superficie de las microesferas anticuerpos específicos que reconocen diferentes proteínas de interés, por ejemplo, marcadores de atrofia intestinal.

En la presente invención, el término "fluorocromo" se refiere a un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de longitud de onda diferente. La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorocromo como de su ambiente químico. Algunos ejemplos de fluorocromos que pueden ser empleados en la presente invención, pero sin limitarse, son rodamina, fluoresceína o dansilo.

Así, el inmunoensayo utilizado para la puesta en práctica del método de la presente invención, preferentemente utilizando la técnica de Luminex, puede ser utilizado para

determinar la cantidad y así cuantificar, la concentración o nivel de anticuerpos anti-TG2, anti-PDG y anti-TG2-PDG, en una muestra ya que la cantidad de anticuerpo presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada. A su vez mediante dicha técnica se determina la presencia de los alelos que caracterizan los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

El término "muestra biológica", tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una muestra, preferiblemente, un fluido biológico, más preferiblemente, una muestra de saliva, sangre, sangre periférica y/o suero, aislada de un sujeto.

En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que la muestra biológica aislada se selecciona entre sangre, preferentemente, sangre periférica, o suero.

El término "sangre periférica" se relaciona con el volumen de sangre circulante distante del corazón, esto es, la sangre que circula por el organismo de un sujeto. La muestra de sangre puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por el técnico en la materia. El término "suero", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al componente de la sangre resultante tras la coagulación de ésta y eliminación del coágulo resultante. Métodos de obtención de muestras de sangre a partir de un sujeto están ampliamente recogidos en el estado de la técnica, así como métodos de obtención de suero a partir de muestras de sangre.

En otra realización preferida del primer método de la invención, éste se caracteriza por que el sujeto es humano.

El término "sujeto", tal como se usa en la invención, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro*, de aquí en adelante segundo método de la invención, de celiacuía, en una muestra biológica aislada de un sujeto, que comprende:

- 5 a) la detección y/o cuantificación conjunta de marcadores serológicos y genéticos donde los marcadores serológicos se seleccionan entre: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2, anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y el marcador genético es HLA-DQ en una muestra biológica aislada de un sujeto; y
- 10 b) la asociación de la detección de los marcadores serológicos y genéticos obtenida en el paso a) con un riesgo genético determinado de padecer la enfermedad.

15 El término "*in vitro*" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

20 El término "diagnóstico", tal como se usa en el primer método de la invención, comprende la determinación de si un sujeto tiene actualmente la enfermedad. Tal como entenderá el experto en la técnica, tal evaluación normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse, aunque preferiblemente es correcta. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que padece la enfermedad. Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarlo de manera sencilla el experto en la técnica usando varias herramientas de evaluación estadísticas bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza,

25 la determinación de valores de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%.

30 En una realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

35 En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por la presencia conjunta de los alelos: *DQA1*05* y *DQB1*02*.

En otra realización preferida del segundo método de la invención éste se caracteriza por que el alelo *DQA1*05* se selecciona entre *DQA1*05:01* y *DQA1*05:05* y el alelo *DQB1*02* se selecciona entre *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.

5 En otra realización preferida del segundo método de la invención éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*05:01* o *DQA1*05:05* junto con al menos uno de los alelos *DQB1*02:01* o *DQB1*02:02*.

10 En otra realización preferida del segundo método de la invención éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*. En otra realización preferida el alelo *DQA1*03* se selecciona entre: *DQA1*03:01* y *DQA1*03:02*.

15 En otra realización preferida del segundo método de la invención éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*03:01* o *DQA1*03:02* junto con la presencia del alelo *DQB1*03:02*.

20 Así, en una primera etapa del segundo método de la invención [etapa a)], se determina en una muestra biológica aislada de un sujeto, la detección y/o cuantificación conjunta de:

- i) marcadores serológicos: anticuerpos anti-TG2, anticuerpos anti-PDG, anticuerpos anti-neoepítomos que surgen de la unión entre TG2-PDG; y
- ii) el marcador genético HLA-DQ.

25 En una segunda etapa del segundo método de la invención [etapa b)], se determina el riesgo genético específico que presenta un sujeto para padecer la enfermedad, dependiendo de los resultados obtenidos en la etapa a) del método. Así, en función de los anticuerpos y alelos y/o oligonucleótidos detectados en la muestra biológica
30 analizada del sujeto, se determina el riesgo genético de que dicho sujeto padezca o no la enfermedad.

En una realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

35

En una realización preferida, el segundo método de la invención se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y la ausencia de los marcadores genéticos completos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiacía.

En otra realización preferida del segundo método de la invención, se determina que un sujeto presenta alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando presenta anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

En otra realización preferida del segundo método de la invención, se determina que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando presenta anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

En otra realización preferida del segundo método de la invención, se determina que un sujeto presenta bajo riesgo genético de padecer la enfermedad cuando presenta anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y cualquier combinación de alelos en *DQA1* y *DQB1* diferente a las combinaciones descritas para el grupo de alto y moderado riesgo genético.

En una realización más preferida aún, cuando el sujeto clasificado en el grupo de riesgo genético bajo presenta el alelo *DQA1*05* en ausencia del alelo *DQB1*02* tiene mayor riesgo genético de padecer celiacía que si presenta cualquier otra combinación posible de alelos dentro de la categoría de riesgo genético bajo.

En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y la presencia de alelos que determinan la presencia de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiacía. A estos pacientes se les puede atribuir un riesgo genético en función de los alelos HLA que presente en los loci *DQA1* y *DQB1*. Dicho riesgo genético coincide con el

conocido por la comunidad científica y difiere del que los inventores han observado en pacientes que sólo presentan anticuerpos anti-TG2-PDG.

5 En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético muy alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

10 En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

15 En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.

20 En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.

25 En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y la presencia de alelos que determinan la presencia de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía. A estos pacientes se les puede atribuir un riesgo genético en función de los alelos HLA que presente en los loci *DQA1* y *DQB1*. Dicho riesgo
30 genético coincide con el conocido por la comunidad científica y difiere del que los inventores han observado en pacientes que sólo presentan anticuerpos anti-TG2-PDG.

35 Así, en otra realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta muy alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

5

En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.

10

En una realización más preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que se considera que un sujeto presenta riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.

15

En otra realización preferida, en ausencia de todos los marcadores serológicos mencionados previamente se considera muy improbable que un sujeto pueda padecer la enfermedad.

20

En una realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que comprende además la detección y/o cuantificación de al menos un marcador de atrofia intestinal, preferentemente la detección del marcador REG1A (*regenerating islet-derived 1 alpha*).

25

En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG).

30

En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de los marcadores serológicos se realiza mediante un inmunoensayo y la detección de los marcadores genéticos se realiza mediante PCR, preferentemente, PCR-SSOP o PCR-SSO.

35

En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que la detección de los marcadores serológicos y genéticos se determina mediante la tecnología Luminex, según se ha explicado anteriormente.

En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que la muestra biológica aislada se selecciona entre sangre, preferentemente sangre periférica, o suero.

- 5 En otra realización preferida del segundo método de la invención, éste se caracteriza por que el sujeto es humano.

10 El método *in vitro* descrito en la presente invención, es por lo tanto, un método analítico rutinario, sencillo, rápido y considerablemente menos invasivo que el estudio de biopsias, para el cribado previo y diagnóstico de sujetos que padecen la enfermedad celíaca, siendo capaz además de diagnosticar a grupos específicos de pacientes que escapan de los criterios descritos en las guías para el diagnóstico de la enfermedad.

- 15 Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un kit que comprende anticuerpos, sondas u oligonucleótidos específicos capaces de detectar y/o cuantificar simultáneamente, marcadores serológicos y genéticos, donde los marcadores serológicos se seleccionan entre: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2, anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y anticuerpos frente a
20 neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y el marcador genético HLA-DQ.

En una realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

- 25 En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ2 se detecta mediante sondas u oligonucleótidos específicos que detectan los alelos: *DQA1*05* y *DQB1*02*.

- 30 En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que las sondas u oligonucleótidos específicos detectan los alelos *DQA1*05:01*, *DQA1*05:05*, *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.

- 35 En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que el marcador genético HLA-DQ8 se detecta mediante sondas u oligonucleótidos específicos que detectan los alelos: *DQA1*03* y *DQB1*03:02*.

En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que las sondas u oligonucleótidos específicos detectan los alelos: *DQA1*03:01*, *DQA1*03:02* y *DQB1*03:02*.

5 En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG). Estos métodos de detección de anticuerpos suponen métodos analíticos rutinarios, sencillos, rápidos y considerablemente menos invasivos que el estudio de biopsias para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. Los anticuerpos utilizados en la presente invención se han
10 descrito previamente.

En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que los marcadores serológicos y genéticos son detectados en una muestra biológica aislada de un sujeto.

15

En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que la muestra biológica se selecciona entre sangre, preferentemente sangre periférica, o suero.

20

En otra realización preferida, el kit de la invención se caracteriza por que el sujeto es humano.

25

El kit de la invención puede comprender además, sin ningún tipo de limitación, anticuerpos primarios específicos de las proteínas de la invención, conjugados o no conjugados, péptidos, tampones, anticuerpos secundarios conjugados, estreptavidina conjugada, proteínas o péptidos patrones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc.

30

Por otro lado, el kit de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit de la invención puede contener además otras proteínas o péptidos que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, estos kits comprenden además las instrucciones para llevar a cabo los métodos descritos en la presente invención.

35

Opcionalmente, los antígenos y sondas de la invención, están marcados o inmovilizados en los kits de la invención. Preferiblemente, éstos están marcados con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador

fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima o un sustrato de una enzima. Más preferiblemente, los antígenos y sondas están inmovilizados en los kits de la invención. El término "inmovilizado", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a que los antígenos o las sondas oligonucleotídicas pueden estar unidos a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz (por ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico similar, o bien cuentas (esferas, por ejemplo, microesferas de poliestireno, esferas de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso del kit descrito previamente para llevar a cabo los métodos de la invención, específicamente para el diagnóstico *in vitro* de celiaquía en un sujeto, siendo preferentemente dicho sujeto un ser humano.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la enfermedad celíaca en un sujeto mediante la detección conjunta de marcadores serológicos y genéticos mencionados en la presente invención, preferentemente, mediante el uso del método *in vitro* y del kit descritos en la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Aplicación de los dos algoritmos, para los pacientes sintomáticos y asintomáticos, desarrollado por la ESPGHAN para diagnosticar a enfermos celíacos.

A) Pacientes asintomáticos con riesgo genético a padecer celiaquía (PAcRG). Después de testar IgA frente a TG2. En estos individuos se determina en primer lugar la presencia de HLA-DQ2/DQ8. Se estudian dos individuos con estas características. Los dos individuos presentan HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, por lo que

posteriormente determina la presencia de anticuerpos anti-TG2 y la IgA total. Con niveles normales de IgA, ninguno de los individuos presenta anticuerpos anti-TG2, por lo que se diagnostican como “No EC”, es decir no padecen celiacía.

5 **B) Niños/adolescentes con clínica sugerente de enfermedad celíaca (CSEC). Después de testar IgA frente a TG2.** En estos individuos se determina la presencia de anticuerpos anti-TG2 y la IgA total. Se estudian 13 individuos con estas características. Con niveles normales de IgA, ninguno de los 13 individuos presenta anticuerpos anti-TG2, por lo que se diagnostican como “No EC”; es decir no padecen
10 celiacía.

C) Pacientes asintomáticos con riesgo genético a padecer celiacía (PACRG). Después de testar IgA frente a TG2, PDG o neoepítomos que emergen de la unión TG2-PDG. En estos individuos se determina en primer lugar la presencia de HLA-
15 DQ2/DQ8. Se estudian dos individuos con estas características. Los dos individuos presentan HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, por lo que se determina la presencia de anticuerpos anti-TG2, PDG o neoepítomos y la IgA total. Los dos individuos presentan anticuerpos anti-TG2, PDG o neoepítomos con un nivel inferior a 3 veces el límite superior de la normalidad, por lo que se determina la presencia de anticuerpos frente a
20 EMA. Los dos individuos son EMA negativos, por lo que se diagnostican como “No EC”; es decir no padecen celiacía.

**D) Niños/adolescentes con clínica sugerente de enfermedad celíaca (CSEC). Después de testar IgA frente a TG2, PDG o neoepítomos que emergen de TG2-
25 PDG.** En estos individuos se determina la presencia de anticuerpos anti-TG2, -PDG o -neoepítomos y la IgA total. Se estudian 13 individuos con estas características, todos ellos con anticuerpos anti-TG2, -PDG o -neoepítomos por lo que se derivan al especialista. Nueve de estos individuos presentan valores de estos anticuerpos superiores a 10 veces el límite superior de la normalidad, por lo que se determina la
30 presencia de anticuerpos frente a EMA y de HLA-DQ2/DQ8. Cuatro de estos individuos son EMA negativos y HLA-DQ2/DQ8 negativos, por lo que se diagnostican como “No EC”. Cinco de estos individuos son EMA negativos pero presentan HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, por lo que se realiza una biopsia intestinal, cuyo análisis refleja un Marsh 2 ó 3 y por tanto los cinco individuos son diagnosticados de “EC”; es decir
35 padecen celiacía.

E) Niños/adolescentes con clínica sugerente de enfermedad celíaca (CSEC). Después de testar IgA frente a TG2, PDG o neoepítomos que emergen de la unión TG2-PDG. En estos individuos se determina la presencia de anticuerpos anti-TG2, -PDG o -neoepítomos y la IgA total. Se estudian 13 individuos con estas características, todos ellos con anticuerpos anti-TG2, -PDG o -neoepítomos por lo que se derivan al especialista. Cuatro de estos individuos presentan valores de TG2 inferiores a 10 veces el límite superior de la normalidad, por lo que se realiza una biopsia intestinal, cuyo análisis refleja un Marsh 2 ó 3 y por tanto los cuatro individuos son diagnosticados de "EC"; es decir padecen celiaquía.

5

10

N indica el número inicial de individuos examinados. +: positivo; -: negativo; LS: límite superior de la normalidad. Los números en los cuadrados indican el número de individuos con la decisión final indicada en el cuadro adyacente.

EJEMPLOS

15

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

20

Ejemplo 1. Población de estudio.

Se revisaron retrospectivamente los resultados de todas las pruebas serológicas realizadas para el diagnóstico de EC en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos (Madrid, España) para pacientes del citado hospital desde enero de 2005, cuando comenzó a utilizarse el kit Aeskulisa® tTg-A, que detecta IgA frente a TG2, PDG y/o neoepítomos que surgen tras la unión TG2-PDG, hasta Junio de 2012. Se seleccionaron todos los individuos que presentaban anticuerpos positivos con el citado kit pero que carecían de anticuerpos anti-endomisio (EMA). La selección de tal grupo de individuos se basó en que atendiendo a las guías diagnósticas existentes, la gran mayoría de esos individuos se consideraría que no presentaban la enfermedad, puesto que la enfermedad celíaca en individuos que son EMA negativos se considera un evento muy poco frecuente. El objetivo fue por tanto conocer si dentro del grupo de estudio definido previamente existía algún caso de EC.

35

Teniendo en cuenta dichos criterios, se incluyeron en el estudio todos los individuos positivos para los anticuerpos anti-TG2-PDG, pero negativos para anticuerpos frente a EMA en el momento del diagnóstico: 374 pacientes, 105 de ellos pediátricos. Se registraron todos los datos disponibles relativos a la histología de las biopsias duodenales, al genotipado HLA (antígenos leucocitarios humanos) para *DRB1*, *DQA1* y *DQB1* (que incluye la presencia de los alelos *DQA1*05:01*, *DQA1*05:05*, *DQB1*02:01*, *DQB1*02:02*, *DQA1*03:01*, *DQA1*03:02* y *DQB1*03:02*) y al motivo de consulta para la evaluación de la EC (síntomas y signos clínicos, condiciones asociadas a EC), así como los resultados de las pruebas serológicas específicas para EC realizadas adicionalmente.

Con el fin de establecer comparaciones, se seleccionó un número de pacientes EMA positivos con similar edad de debut y sexo.

La EC se diagnosticó de acuerdo con los criterios de la ESPGHAN (Husby S, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-60; *Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child* 1990;65:909-11). Para el diagnóstico de los sujetos adultos, se consideraron también otras guías clínicas publicadas (AGA. *Gastroenterology* 2006; 131:1977-80; Bai JC, et al. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47:121-6). Todos los pacientes diagnosticados de EC tenían además, dicha confirmación de la enfermedad mediante biopsia duodenal con la excepción de 18 sujetos adultos que rechazaron la endoscopia o sus resultados no resultaron concluyentes y se utilizó la remisión analítica y clínica tras dieta sin gluten para confirmar la presencia de EC.

Ejemplo 2. Pruebas serológicas, genotipado HLA y análisis histológico.

Se analizaron los anticuerpos IgA anti-TG2-PDG e IgG anti-PDG en suero utilizando los kit comerciales: Aeskulisa® tTg-A (Grifols, Wendelsheim, Alemania), que utiliza como antígeno TG2 humana recombinante y péptidos específicos de gliadina y que permite reconocer neoepítotos (punto de corte recomendado por el fabricante > 20 U/ml) y el kit Euroimmun (Euroimmun, Lübeck, Alemania), que utiliza como antígeno formas deamidadas de péptidos de gliadina (punto de corte recomendado por el fabricante > 25 U/ml), respectivamente. Los anticuerpos IgA anti-EMA se determinaron por la técnica de inmunofluorescencia con una dilución 1:5 en cortes de tejidos comerciales de esófago de mono como sustrato antigénico.

Para el genotipado HLA de los pacientes se extrajo el ADN a partir de leucocitos de sangre periférica fresca por el procedimiento *salting out* (Miller, S. A. et al. *Nucleic Acids Research*. 1988;16 (3): 1215). Se realizó el genotipado HLA mediante PCR-SSOP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia) para *DRB1*, *DQA1* y *DQB1*, o utilizando PCR-SSO (Reacción en Cadena de la Polimerasa-oligonucleótidos específicos de secuencia) por la tecnología Luminex (Tepnel Lifecodes Corp, Stamford, CT EEUU) para *DRB1* y *DQB1* (el *DQA1* se extrapola a través de la combinación de *DRB1* y *DQB1*). Algunos individuos fueron genotipados por ambos métodos obteniéndose resultados similares.

10

Las biopsias fueron realizadas por médicos especialistas y se procesaron y examinaron por patólogos. Los cambios histopatológicos fueron clasificados de acuerdo a los criterios modificados de Marsh-Oberhuber (Oberhuber G, et al. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94).

15

Las características basales entre los individuos anti-TG2-PDG positivos y EMA negativos, diagnosticados o no de EC, se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney o el test chi cuadrado, dependiendo de si se trataba de variables continuas o categóricas.

20

Ejemplo 3. Resultados.

Inicialmente se consideraron dos grupos de individuos IgA anti- TG2-PDG positivos y EMA negativos: 105 niños o adolescentes y 269 adultos. Después de una revisión de los datos recogidos, se excluyeron tres adultos porque murieron antes de haberse llegado a un diagnóstico. Por lo tanto, nuestra muestra fue de 371 individuos, 266 adultos y 105 niños o adolescentes. En la **Tabla 1** se resumen las principales características demográficas y características clínicas y de diagnóstico relacionadas con la EC de los individuos incluidos en el estudio.

30

En dicha **Tabla 1**, se observan individuos de cualquier edad, que muestran un amplio rango de niveles de anti-TG2-PDG y que presentan o no anticuerpos anti-PDG. Su presentación clínica es la que generalmente se observa en niños o adultos que están siendo estudiados por posible EC.

35

Tabla 1. Descripción de los individuos anti-TG2-PDG positivos EMA negativos clasificados atendiendo al momento de estudio.

	Pediátricos	Adultos
Número de individuos	105	266
Mujeres (%)	37 (35,2)	158 (59,4)
Edad tests serológicos (años)		
Media ± ES	5,6 ± 0,4	50,0 ± 1,1
Rango	1 -16	17 - 86
Niveles de IgA TG2-PDG		
Media ± ES	87,0 ± 9,3	80,8 ± 4,8
Rango	20,1 - 300,0	20,0 - 300,0
IgG PDG^a		
Positivos ^b	21,7%	6,7%
Media ± ES	58,0 ± 13,8	72,9 ± 14,4
Rango	25,0 - 200,0	25,2 - 188,0
Presentación clínica		
<u>Clásica</u>		
Diarrea	26,8	35,3
Dolor abdominal	23,2	41,5
Baja estatura/retraso crecimiento	28,0	-
Pérdida de peso	18,3	8,0
<u>No clásica</u>		
Anemia ferropénica	8,5	25,0
Dermatitis herpetiformis	4,9	2,2
Síntomas neurológicos	1,2	3,6
Hipertransaminasemia	2,4	19,2
Déficit de Ácido fólico, hierro o Vit. B12	1,2	6,3
Osteoporosis	0	2,2
Otros	7,3	7,6
<u>Asintomáticos</u>		
Parientes de primer grado	2,4	0
Síndrome de Down	7,3	0
Enfermedad tiroidea autoinmune	1,2	0
Diabetes Tipo 1	0	0

Los datos clínicos estaban disponibles para 82 niños/adolescentes y 224 adultos
^aIgG PDG se midió en 60 niños/adolescentes y 178 adultos, puesto que estos anticuerpos se comenzaron a evaluar en Agosto de 2008, cuando sustituyeron a IgA anti-gliadina,

5 ^b37,5% (6/16) de niños menores de 2 años mostraron IgG PDG.

En la **Tabla 2** se muestran las principales características de individuos diagnosticados y no diagnosticados de EC clasificados en pediátricos o adultos de acuerdo al
 10 momento de realización del cribado de EC. El porcentaje de casos de EC en la muestra es del 14% en niños/adolescentes y 15% en adultos. En 8 niños, el diagnóstico final no se ha establecido todavía y es necesario realizar un seguimiento, con lo cual el porcentaje de celíacos en niños/adolescentes podría llegar a alcanzar el 22%. No se observan diferencias de género en los niños o adultos diagnosticados o no
 15 de EC. Se observa una media y un rango similar en la edad al momento de la detección de anticuerpos para los individuos EC y no EC, tanto en niños como adultos.

Al analizar los niveles de IgA frente a TG2-PDG, los niños con EC presentan una media significativamente mayor que los niños no diagnosticados de EC (188,6 en EC
 20 vs 70,1 en no EC, $p_{1\text{ cola}} = 0,002$). No se observaron diferencias significativas en los adultos (78,3 en EC vs 82,1 en no EC, $p_{1\text{ cola}} = 0,39$). Existe un mayor porcentaje de individuos PDG positivos en el grupo con EC vs. el grupo no diagnosticado de EC, aunque la diferencia no es significativa. Los niveles medios de IgG PDG son significativamente superiores en niños con EC que en los no diagnosticados de EC
 25 (188,6 vs. 70,1 respectivamente, $p_{1\text{ cola}} = 0,002$) y lo mismo ocurre en el grupo de adultos (138,0 vs. 51,2, respectivamente, $p_{1\text{ cola}} = 0,018$) Debido a que los anticuerpos PDG parecen ser especialmente útiles en el diagnóstico de los niños menores de 2 años de edad, se consideró a este grupo de forma individual, pero sólo comprendía a 3 niños en donde sólo uno era seropositivo para PDG y mostraba niveles elevados del anticuerpo (200).
 30

También se observó una presentación clínica clásica en todos los niños diagnosticados de EC excepto en tres: dos mostraron anemia por déficit de hierro y uno era asintomático pero se estudió porque presentaba síndrome de Down. En los
 35 adultos, las manifestaciones clínicas más comunes fueron la anemia por déficit de hierro y el dolor abdominal , pero también se encontraron otros síntomas clásicos y no clásicos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales características de individuos diagnosticados de enfermedad celíaca (EC) y no diagnosticados (no EC) clasificados atendiendo a la edad de diagnóstico.

	Pediátricos			Adultos		
	EC	No EC	p	EC	No EC	p
Número (%) de individuos	15 (14,3)	90 (85,7)		39 (14,8)	224 (85,2)	
Mujeres (%)	4 (26,7)	33 (36,7)	0,45	26 (66,7)	130 (58,0)	0,31
Edad de diagnóstico						
Media \pm ES	5,1 \pm 1,4	-		47,9 \pm 2,8	-	
Rango	1 - 15	-		23 - 76	-	
Edad tests serológicos (años)						
Media \pm ES	4,7 \pm 1,1	5,7 \pm 0,5	0,30	48,6 \pm 2,6	50,4 \pm 1,2	0,54
Rango	1 - 14	1 - 16		21 - 86	17 - 85	
Niveles de IgA TG2-neoepitopos						
Media \pm ES	188,6 \pm 31,5	70,1 \pm 8,4	0,002	78,3 \pm 12,2	82,1 \pm 5,3	0,39
Rango	23,3 - 300,0	20,1 - 300,0		20,7 - 300,0	20,0 - 300,0	
IgG PDG						
Positivos ^a	25,0%	8,3%	0,45	13,0%	5,9%	0,19
Media \pm ES	106,4 \pm 47,5	41,9 \pm 5,7	0,032	138,0 \pm 25,5	51,2 \pm 9,7	0,018
Rango	45,2 - 200,0	25,0 - 67,3		104,0 - 188,0	25,2 - 123,0	
Presentación clínica						
<u>Clásica</u>						
Diarrea	33,3	25,4		28,2	35,1	

Tabla 2 (cont).

	Pediátricos			Adultos		
	EC	No EC	p	EC	No EC	p
Dolor abdominal	13,3	25,4		38,5	41,6	
Baja estatura/retraso crecimiento	40,0	25,4		-	-	
Pérdida de peso	13,3	19,4		7,7	8,1	
<u>No clásica</u>						
Anemia ferropénica	13,3	7,5		46,2	21,6	
Dermatitis herpetiformis	0	6,0		2,6	1,1	
Síntomas neurológicos	0	1,5		7,7	2,7	
Hipertransaminasemia	0	3,0		15,4	20,0	
Déficit de Ácido fólico, hierro o Vit. B12	0	1,5		10,3	4,9	
Osteoporosis	0	0,0		7,7	1,1	
Otros	0	9,0		20,5	9,2	
Potencial	0	-		-	-	
<u>Asintomáticos</u>						
Parientes de primer grado	0	3,0		0	0	
Síndrome de Down	6,7	7,5		0	0	
Enfermedad tiroidea autoinmune	0	1,5		0	0	
Diabetes tipo I	0	0		0	0	

La edad de diagnóstico se calculó de acuerdo a la fecha de realización de la biopsia. Se pudieron recoger los datos clínicos de 82 niños/adolescentes y 224 adultos, en los que se incluían todos los individuos diagnosticados de EC.

^a 33,3% (1/3) de niños menores de 2 años mostraron IgG PDG, el cual mostró un valor de 200.

Para los casos de EC, en la **Tabla 3** se muestra la constitución HLA detallada de acuerdo a las diferentes categorías de riesgo genético. Con el fin de establecer comparaciones, también mostramos datos HLA disponibles de nuestros pacientes con EC (con pruebas serológicas realizadas antes de utilizar Aeskulisa® tTg-A (n = 485)),
5 este grupo se identifica en la **Tabla 3** como EC. Debido a nuestro bajo número de pacientes con EC EMA-negativo (15 pacientes pediátricos y 21 pacientes adultos), elegimos al azar un número similar de EC EMA-positivos del mismo sexo y edad, para determinar si son un grupo representativo del total de EC. Por último, se incluyó el HLA de un grupo de individuos sin enfermedades mediadas por el sistema inmunitario,
10 y por lo tanto utilizados como control.

Como se muestra en la **Tabla 3**, el 53% de los pacientes celíacos pediátricos y el 52% de los adultos presentaban la molécula HLA-DQ2. Estos valores siguen siendo superiores a los observados en los controles, pero difieren del 94-100% presente en
15 los grupos de celíacos empleados para establecer comparaciones. Cuando miramos a los individuos no-DQ2, el grupo mayoritario de pacientes con IgA frente a TG2-PDG (que incluye detección de neoepítomos) pero EMA negativos presentaba *DQA1*05*, que aparece en el 41% de estos pacientes no-DQ2, pero sólo en 0-4% de los pacientes no-DQ2 en los otros grupos de EC; y el DQ8 estaba presente en el 61% de
20 los 485 celíacos no-DQ2, pero sólo en el 14% o el 40% de nuestra muestra no-DQ2, en función de si se consideran niños/adolescentes o adultos.

Tabla 3. Distribución del riesgo genético HLA (N, %) en los diferentes grupos de enfermos celíacos (EC) y controles

Riesgo genético de EC	EC EMA -negativos		EC EMA-positivos		EC ^a		Controles	
	Pediátricos	Adultos	Pediátricos	Adultos				
Muy alto								
DQ2.5 cis+DQ2.5 cis	0	1	3	2	59	12,2	9	1,4
DQ2.5 cis+DQ2.2	1	4	5	7	131	27,0	21	3,3
Alto								
DQ2.5 cis+no-DQ2.2	5	6	6	8	204	42,1	129	20,5
DQ2.5 trans	2	0	1	6	63	13,0	29	4,6
DQ8+DQ8	0	0	0	0	3	0,6	1	0,2
Moderado								
DQ8+no-DQ8	1	4	0	1	14	2,9	79	12,6
Bajo								
DQ2.2+ no-DQ2.2/no-DQ8	1	1	0	0	9	1,9	98	15,6
Nulo								
DQA1*05	3	4	0	0	1	0,2	117	18,6
Otros	2	1	0	0	1	0,2	145	23,1

^a EC diagnosticada antes de determinarse los anticuerpos que incluyen la detección frente a neopeptidos resultantes de la unión TG2-PDG. DQ2.5= DQB1*02-DQA1*05; DQ2.2= DQB1*02:02-DQA1*02:01. DQ8=DQB1*03-DQA1*03:02.

Sorprendentemente, el 8% de los niños y adultos estudiados, no tienen ningún alelo que codifica DQ2 o DQ8 (**Tabla 4**). La ausencia de esos alelos se observó sólo en un paciente de los 485 pacientes disponibles para comparar y los resultados serológicos mostraron que este paciente era sólo seropositivo para anticuerpos frente a gliadina.

5 Los dos grupos de pacientes EMA seropositivos muestran una constitución HLA similar a la observada en los 485 celíacos.

10 Dos de los tres pacientes que carecen de *DQB1*02* y *DQA1*05* muestran *DQB1*05*. Sin embargo, este alelo HLA también es muy común en nuestros controles. *DQB1*06* está presente en todos los celíacos no-DQ2/DQ8, pero también es muy común en los controles.

Tabla 4. Constitución HLA de los pacientes no-DQ2/DQ8 con enfermedad celíaca.

Debut	<i>DRB1_1</i>	<i>DRB1_2</i>	<i>DQA1_1</i>	<i>DQA1_2</i>	<i>DQB1_1</i>	<i>DQB1_2</i>
Pediátrico	6	2	01:03	01:02	06:03	06:02
Pediátrico	1	6	01:01	01:03	05:01	06:03
Adulto	2	2	01:02	01*	06:02	05:01

15

20 Por último, quisimos determinar el diagnóstico más probable de los niños y adolescentes con EC de nuestra muestra siguiendo los recientes algoritmos para diagnóstico propuestos por la ESPHGAN, después de usar la mayoría de los kits comerciales para TG2 o el kit que reconoce TG2, PDG y neoepítomos que emergen tras la unión TG2-PDG Aeskulisa® tTg-A, que se utiliza en la presente invención. Esto se llevó a cabo en el grupo pediátrico, ya que las guías clínicas mencionadas están enfocadas a niños y adolescentes. En la **Figura 1** se muestra la aplicación de dos algoritmos de reciente publicación:

25

- 1) para niños y adolescentes con síntomas y signos no explicados, que son sugerentes de EC (13 de nuestros 15 celíacos pediátricos);
- 2) para niños y adolescentes sin síntomas sugerentes de EC que pertenecen a un grupo de alto riesgo genético (2 de nuestros 15 celíacos pediátricos).

30

Al utilizar la mayoría de los kits comerciales para TG2 (**Figuras 1 y 1B**), que es lo más extendido en la práctica clínica habitual, la totalidad de la muestra de pacientes se

habría considerado TG2 negativa. Hay que indicar, que teniendo en cuenta la alta correlación existente entre la presencia de anticuerpos anti-TG2 y anti-EMA, se asumió que todos aquellos pacientes que fueran EMA negativos, también serían negativos para anti-TG2. Con el empleo de estos kits, lo más probable es que se
5 hubiera considerado una causa distinta a la EC en los 15 pacientes, tanto en los dos asintomáticos pertenecientes a grupos de riesgo (Figura 1A) como en los 13 que presentan clínica sugerente de EC (Figura 1B).

Al utilizar un kit que detecta neoepítomos que surgen tras la unión de TG2-PDG
10 (**Figuras 1C, 1D y 1E**), los dos celíacos asintomáticos no habrían sido diagnosticados de EC, aunque se habría recomendado realizar más pruebas serológicas (**Figura 1C**); 9 de los 13 individuos con síntomas habrían sido diagnosticados de EC y 4 no habrían recibido un diagnóstico de EC debido a la seronegatividad del EMA y a su genética HLA (**Figuras 1D y 1E**). Si a esto añadiésemos las características genéticas que
15 presentan estos pacientes con anticuerpos frente a neoepítomos TG2-PDG pero no frente a TG2, que ha observado el equipo inventor, se podría considerar un diagnóstico de EC en todos los pacientes.

Una estimación aproximada del peso que el grupo de pacientes de EC caracterizado
20 por los inventores (anti-TG2-PDG positivo EMA-negativo) representa en el total de pacientes con EC (para el que se han considerado como pacientes con EC todos aquellos con EMA positivo determinado en el mismo período de tiempo que comprende el grupo de estudio), indica que este grupo representa un 13% de la EC total diagnosticada. Conviene indicar, que puesto que la mayoría de estos pacientes
25 están "fuera" de criterios diagnósticos, consideramos que este valor es una infraestima del porcentaje real.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de celiaquía en una muestra biológica aislada de un sujeto que comprende la detección y/o cuantificación simultánea de marcadores serológicos y genéticos, donde los marcadores serológicos son: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2, anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión y/o entrecruzamiento del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y donde el marcador genético es HLA-DQ.
2. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 1 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona de entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.
3. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 2 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por la presencia conjunta de los alelos: *DQA1*05* y *DQB1*02*.
4. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 3 caracterizado por que el alelo *DQA1*05* se selecciona entre *DQA1*05:01* y *DQA1*05:05* y el alelo *DQB1*02* se selecciona entre *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.
5. Método de obtención de datos útiles según las reivindicaciones 2 a 4 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*05:01* o *DQA1*05:05* junto con al menos uno de los alelos *DQB1*02:01* o *DQB1*02:02*.
6. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 2 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*.
7. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 6 caracterizado por que el alelo *DQA1*03* se selecciona entre: *DQA1*03:01* y *DQA1*03:02*.
8. Método de obtención de datos útiles según las reivindicaciones 6 a 7 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*03:01* o *DQA1*03:02* junto con la presencia del alelo *DQB1*03:02*.

9. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 caracterizado por que la detección de anticuerpos frente a neoepítopos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y la ausencia de los alelos que codifican para los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.
10. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 9 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de alto riesgo genético cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítopos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.
11. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 9 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítopos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.
12. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 9 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de bajo riesgo genético cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítopos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y cualquier combinación de alelos en *DQA1* y *DQB1*, diferente a las combinaciones descritas en las reivindicaciones 9 y 10.
13. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 12 caracterizado por que el sujeto clasificado en el grupo de riesgo genético bajo, tiene mayor riesgo genético de padecer celiaquía si presenta el alelo *DQA1*05* en ausencia del alelo *DQB1*02* que si presenta cualquier otra combinación posible de alelos dentro de la categoría de bajo riesgo genético.
14. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 donde la detección de anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y la presencia de al menos uno de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.

15. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 14 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético muy alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

5

16. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 14 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

10

17. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 14 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.

15

18. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 14 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.

20

19. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 donde la detección de anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y la presencia de al menos uno de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.

25

20. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 19 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de muy alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.

30

21. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 19 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

35

22. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 19 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.
- 5
23. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 19 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.
- 10
24. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 caracterizado por que comprende además la detección y/o cuantificación de al menos un marcador de atrofia intestinal.
- 15
25. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 24 caracterizado por que el marcador de atrofia intestinal es la proteína REG1A.
26. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 caracterizado por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG).
- 20
27. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 caracterizado por que la detección de los marcadores serológicos se realiza mediante un inmunoensayo y la detección de los marcadores genéticos mediante la técnica PCR.
- 25
28. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 27 donde la detección de los marcadores serológicos y genéticos se determina mediante la tecnología Luminex.
- 30
29. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 caracterizado por que la muestra biológica aislada se selecciona entre saliva, sangre o suero.
- 35
30. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 29 caracterizado por que la sangre es sangre periférica.

31. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 caracterizado por que el sujeto es humano.

32. Método *in vitro* para el diagnóstico de celiaquía en un sujeto que comprende:

5

a) la detección y/o cuantificación simultánea de marcadores serológicos y genéticos donde los marcadores serológicos son: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2, anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y anticuerpos frente a neoepítopos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y el marcador genético es HLA-DQ, en una muestra biológica aislada de un sujeto; y

10

b) la asociación de la detección de los marcadores serológicos y genéticos obtenida en el paso a) con un riesgo genético determinado de padecer la enfermedad.

15

33. Método *in vitro* según la reivindicación 32 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ se seleccionan entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

20

34. Método *in vitro* según la reivindicación 33 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por la presencia conjunta de los alelos: *DQA1*05* y *DQB1*02*.

25

35. Método *in vitro* según la reivindicación 34 caracterizado por que el alelo *DQA1*05* se selecciona entre *DQA1*05:01* y *DQA1*05:05* y el alelo *DQB1*02* se selecciona entre *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.

30

36. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ2 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*05:01* o *DQA1*05:05* junto con al menos uno de los alelos *DQB1*02:01* o *DQB1*02:02*.

35

37. Método *in vitro* según la reivindicación 33 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por la presencia conjunta de los alelos *DQA1*03* y *DQB1*03:02*.

38. Método *in vitro* según la reivindicación 37 caracterizado por que el alelo *DQA1*03* se selecciona entre: *DQA1*03:01* y *DQA1*03:02*.
- 5 39. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 38 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ8 está codificado por al menos uno de los alelos *DQA1*03:01* o *DQA1*03:02* junto con la presencia del alelo *DQB1*03:02*.
- 10 40. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39 caracterizado por que la detección de anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y la ausencia de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiaquía.
- 15 41. Método *in vitro* según la reivindicación 40 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de alto riesgo genético cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.
- 20 42. Método *in vitro* según la reivindicación 40 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.
- 25 43. Método *in vitro* según la reivindicación 40 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de bajo riesgo genético cuando se detectan anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina y cualquier combinación de alelos en *DQA1* y *DQB1* diferente a las combinaciones descritas en las reivindicaciones 29 y 30.
- 30 44. Método *in vitro* según la reivindicación 43 caracterizado por que el sujeto clasificado en el grupo de riesgo genético bajo, tiene mayor riesgo genético de padecer celiaquía si presenta el alelo *DQA1*05* en ausencia del alelo *DQB1*02* que si presenta cualquier otra combinación posible de alelos dentro de la categoría de riesgo genético bajo.
- 35 45. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39 donde la detección de anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y la presencia de al menos uno de

los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiacía.

- 5 46. Método *in vitro* según la reivindicación 45 caracterizado por que el sujeto se clasifica como riesgo genético muy alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.
- 10 47. Método *in vitro* según la reivindicación 45 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético alto de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.
- 15 48. Método *in vitro* según la reivindicación 45 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.
- 20 49. Método *in vitro* según la reivindicación 45 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2 y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.
- 25 50. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39 donde la detección de anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y la presencia de al menos uno de los marcadores genéticos HLA-DQ2 o HLA-DQ8 clasifica al sujeto en un grupo de riesgo genético determinado de padecer celiacía.
- 30 51. Método *in vitro* según la reivindicación 50 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de muy alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*05* y dos alelos *DQB1*02*.
- 35 52. Método *in vitro* según la reivindicación 50 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de alto riesgo genético de padecer la enfermedad cuando se

detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y un alelo *DQA1*05* y un alelo *DQB1*02*.

53. Método *in vitro* según la reivindicación 50 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético moderado de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQA1*03* y uno o dos alelos *DQB1*03:02*.
54. Método *in vitro* según la reivindicación 50 caracterizado por que el sujeto se clasifica como de riesgo genético bajo de padecer la enfermedad cuando se detectan anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y uno o dos alelos *DQB1*02* y ningún alelo *DQA1*05*.
55. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 54 caracterizado por que comprende además la detección y/o cuantificación de al menos un marcador de atrofia intestinal.
56. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 55 caracterizado por que el marcador de atrofia intestinal es la proteína REG1A.
57. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 56 caracterizado por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG).
58. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 56 caracterizado por que la detección de los marcadores serológicos se realiza mediante un inmunoensayo y la detección de los marcadores genéticos se realiza mediante PCR.
59. Método *in vitro* según la reivindicación 58 donde la detección de los marcadores serológicos y genéticos se determina mediante la tecnología Luminex.
60. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 59 caracterizado porque la muestra biológica aislada se selecciona entre saliva, sangre o suero.
61. Método *in vitro* según la reivindicación 60 caracterizado porque la sangre es sangre periférica.

62. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 32 a 61 caracterizado por que el sujeto es humano.
- 5 63. Kit que comprende anticuerpos y/o sondas específicos capaces de detectar y/o cuantificar marcadores serológicos y genéticos, donde los marcadores serológicos son: anticuerpos frente a transglutaminasa tipo 2, anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina y anticuerpos frente a neoepítomos que surgen de la unión del complejo transglutaminasa tipo 2-péptidos deamidados de gliadina, y el marcador genético es HLA-DQ.
- 10 64. Kit según la reivindicación 63 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ se selecciona entre: HLA-DQ2 o HLA-DQ8.
- 15 65. Kit según la reivindicación 64 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ2 se detecta mediante sondas específicas que detectan los alelos: *DQA1*05* y *DQB1*02*.
- 20 66. Kit según la reivindicación 65 caracterizado por que las sondas específicas detectan cualquiera de los alelos *DQA1*05:01*, *DQA1*05:05*, *DQB1*02:01* y *DQB1*02:02*.
- 25 67. Kit según la reivindicación 64 caracterizado por que el marcador genético HLA-DQ8 se detecta mediante sondas específicas que detectan los alelos: *DQA1*03* y *DQB1*03:02*.
- 30 68. Kit según la reivindicación 67 caracterizado por que las sondas específicas detectan cualquiera de los alelos: *DQA1*03:01*, *DQA1*03:02* y *DQB1*03:02*.
- 35 69. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 63 a 68 caracterizado por que comprende además anticuerpos capaces de detectar marcadores de atrofia intestinal.
70. Kit según la reivindicación 69 caracterizado por que el marcador de atrofia intestinal es la proteína REG1A.
71. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 63 a 70 caracterizado por que los anticuerpos detectados presentan isotipo A (IgA) o G (IgG).

72. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 63 a 71 caracterizado por que los marcadores serológicos y genéticos son detectados en una muestra biológica aislada de un sujeto.
- 5 73. Kit según la reivindicación 72 caracterizado por que la muestra biológica se selecciona entre saliva, sangre o suero.
74. Kit según la reivindicación 73 caracterizado porque la sangre es sangre periférica.
- 10 75. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 63 a 74 caracterizado por que el sujeto es humano.
76. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 63 a 75 para el diagnóstico *in vitro* de celiaquía en un sujeto.
- 15 77. Uso del kit según la reivindicación 76 donde el sujeto es humano.

A

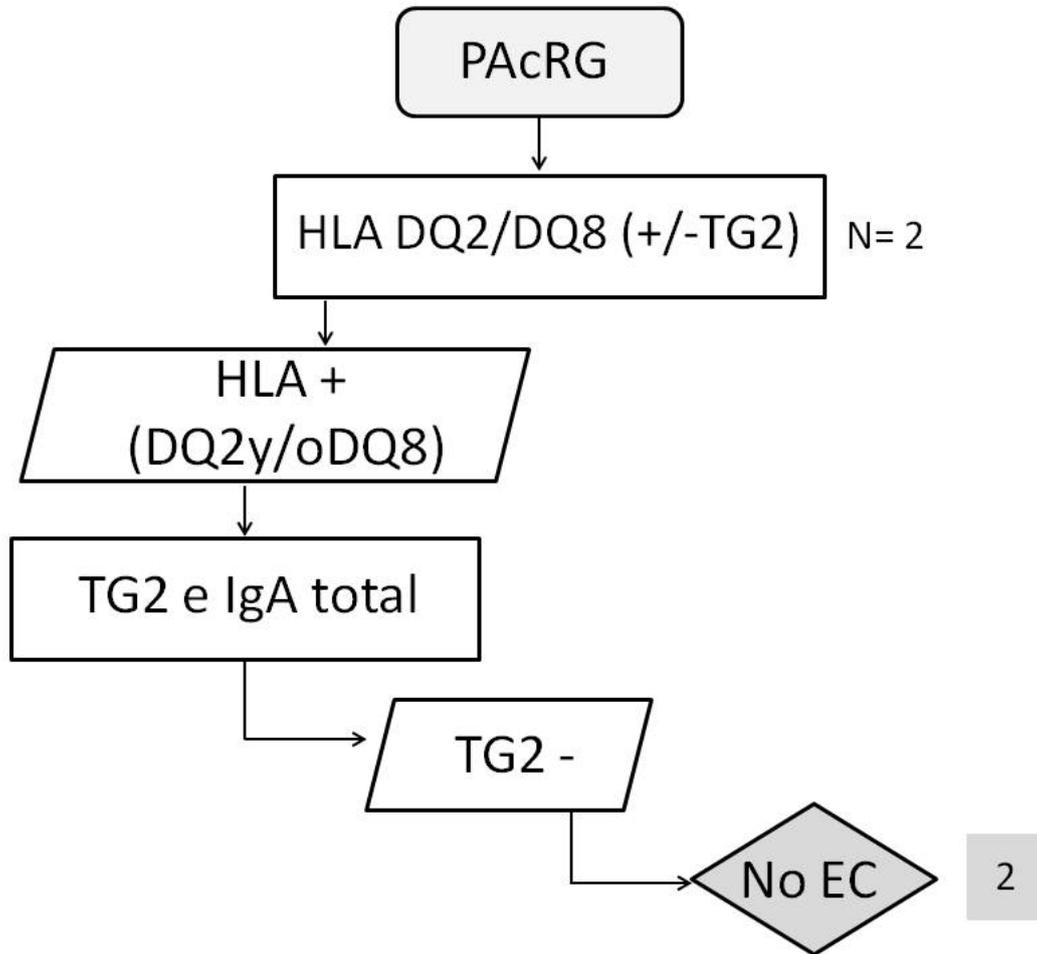


Fig. 1A

B

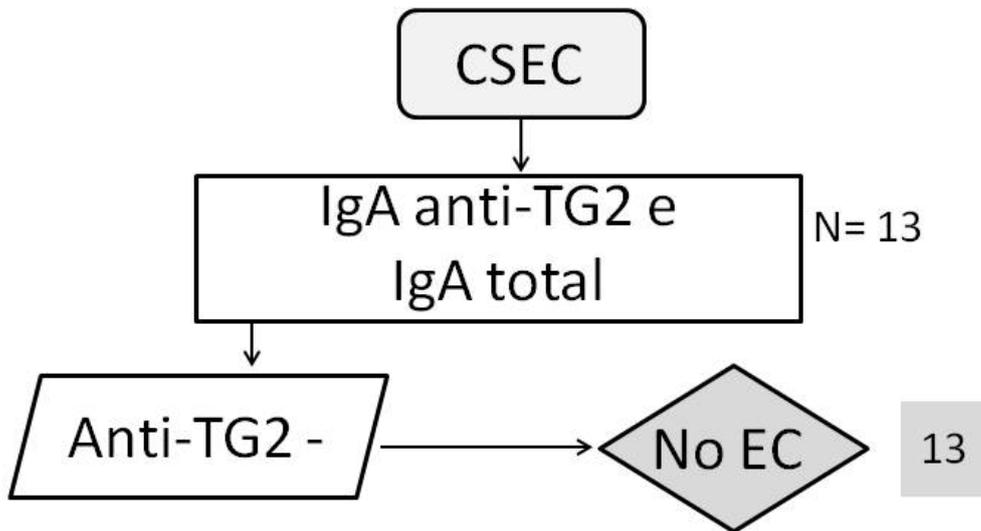


Fig. 1B

C

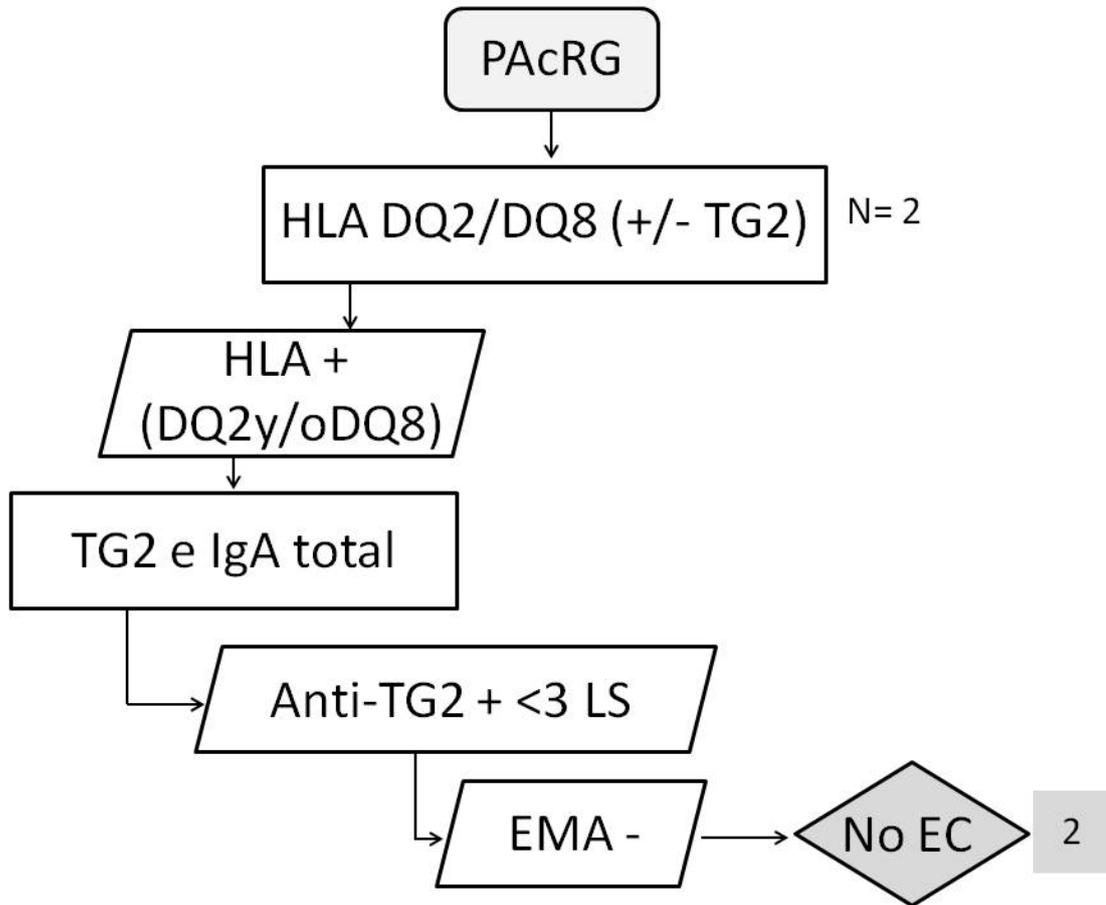


Fig. 1C

E

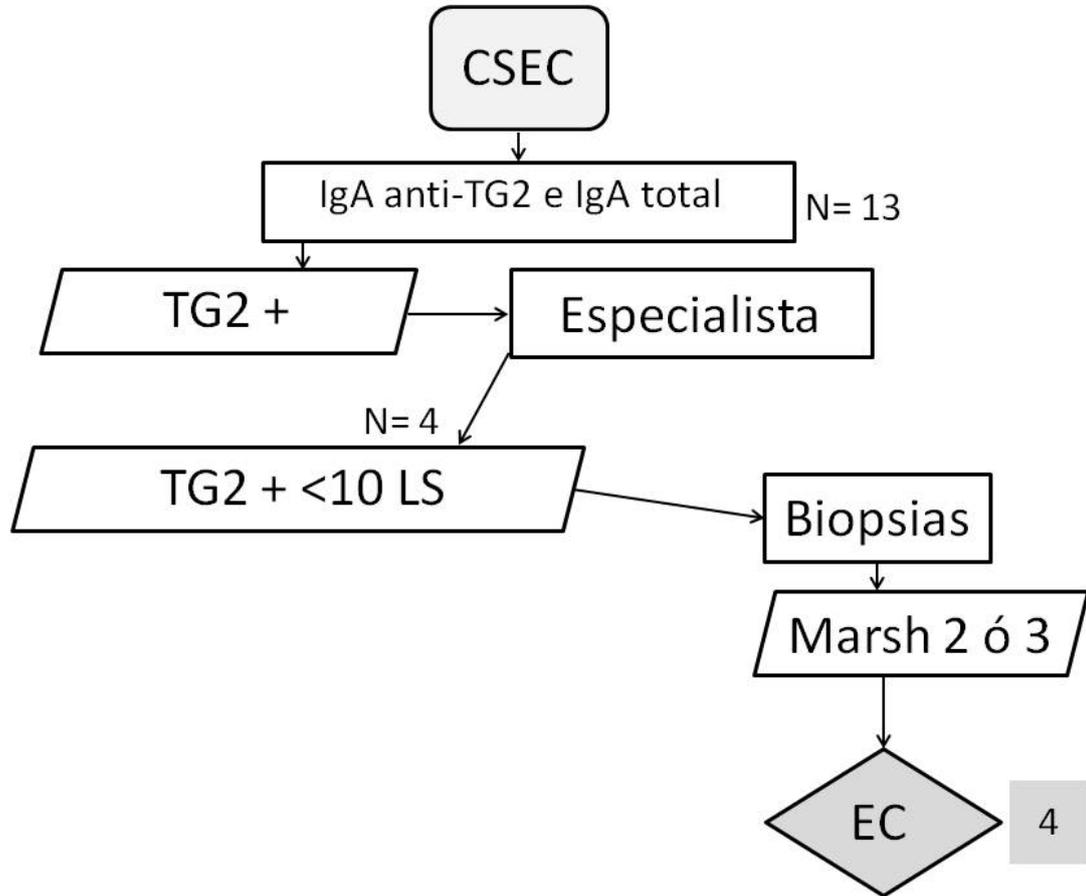


Fig. 1E