

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 177**

21 Número de solicitud: 201400569

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.01.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)
OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de la Delicias
s/n
41013 Sevilla ES y
BIOMEDAL S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORENO AMADOR, María De Lourdes;
SOUSA MARTÍN, Carolina;
RODRÍGUEZ HERRERA, Alfonso y
CEBOLLA RAMÍREZ, Ángel**

74 Agente/Representante:

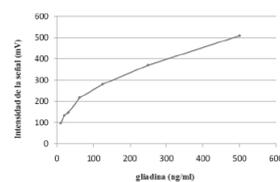
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Detección de péptidos del gluten en fluidos humanos**

57 Resumen:

Detección de péptidos del gluten en fluidos humanos. La presente invención muestra un procedimiento para la detección y cuantificación en fluidos humanos, preferentemente orina, de péptidos del gluten resistentes a la digestión gastrointestinal. La presencia o ausencia de los péptidos del gluten es controlada por ensayos inmunológicos basados en anticuerpos específicos frente a los mismos. Esta metodología es aplicable en el sector médico-clínico, tanto en la verificación del cumplimiento de la dieta sin gluten como en el diagnóstico preciso en intolerancias al gluten, incluido aquellos casos donde persisten los síntomas de enfermedad celíaca a pesar la supuesta ausencia total de ingesta de gluten. También es aplicable en el proceso de investigación y diagnóstico de fármacos para la EC para comprobar la eficacia de las terapias relacionadas con la eliminación o secuestro de péptidos inmunotóxicos del gluten.

Glúten (ng/ml)	Factores de calibración					
	10	20	31,2	42,5	125	250
Intensidad media(mV)	91,2	110	144,8	211,6	289,7	378,5
s	17,6	32,2	25,2	24,2	31,8	42,4
RSD(%)	18,16	24,21	17,15	11,22	11,25	11,44



Rothbard: 907,6 + (59,4-907,6) / (1+X/468,8)^{0,8}

Fig. 1

DETECCIÓN DE PÉPTIDOS DEL GLUTEN EN FLUIDOS HUMANOS

DESCRIPCION

Objeto de la invención

La presente invención muestra un procedimiento para la detección y cuantificación en
5 fluidos humanos, preferentemente orina, de péptidos del gluten resistentes a la
digestión gastrointestinal mediante ensayos inmunológicos. Dichos ensayos pueden
ser técnicas del tipo de las tiras de flujo lateral inmunocromatográficas que pueden
cuantificarse con lector, ELISAs, biosensores, detección con partículas magnéticas,
etc. Esta metodología es aplicable en el sector médico-clínico, tanto en la verificación
10 del cumplimiento de la dieta libre de gluten de los pacientes celíacos, pacientes con
sensibilidad alérgica o en pacientes con cualquier tipo de sensibilidad a las proteínas
del gluten, así como en el diagnóstico preciso de la enfermedad celíaca refractaria, es
decir, en aquellos casos donde persisten los síntomas a pesar la supuesta ausencia
total de ingesta de gluten. También puede aplicarse la invención en investigación
15 clínica de la enfermedad celíaca para comprobar la eficacia de futuras estrategias
relacionadas con la eliminación o disminución de la toxicidad del gluten.

Estado de la técnica

La enfermedad celíaca (EC), trastorno autoinmune provocado por la ingestión de
20 las proteínas del gluten presente en el trigo, la cebada, el centeno y en algunas
variedades de avena (Arent-Hansen et al., 2004; Kagnoff, 2007; Comino et al., 2011)
afecta aproximadamente al 1% de la población general (Rubio-Tapia et al, 2009;
Lionetti and Catassi, 2011; Bernardo and Peña, 2012; Sapone et al., 2012). La ingesta
de gluten provoca en estos pacientes una reacción inflamatoria en la parte superior del
25 intestino delgado que conlleva a daño tisular y a atrofia vellositaria (Kunachowicz,
2001; Rujner, 2002).

Aunque la mayoría de proteínas de la dieta son digeridas por las proteasas
gastrointestinales a aminoácidos simples, dipéptidos o tripéptidos, las proteínas del
gluten no son completamente digeridas y permanecen en el intestino (Ganapathy et
30 al., 2006; Fasano 2009; Comino et al., 2012). Estos péptidos son capaces de
internalizarse en las células intestinales y, como consecuencia, los residuos de
glutamina que poseen pueden ser desaminados por la transglutaminasa tisular (tTG).
Los péptidos desaminados inducen una reacción inmunológica, produciéndose una

disminución de la absorción intestinal que puede dar lugar a síntomas como diarrea, anemia, retraso del crecimiento, pérdida de peso, desórdenes óseos, complicaciones neurológicas, cáncer, etc. (Alaedini and Green, 2005; Catassi and Fasano, 2008; Tack et al., 2010).

5 Existen claras evidencias que avalan la contribución mayoritaria de los epítomos relacionados o contenidos en el péptido 33-mer de la α -2 gliadina del trigo (residuos 57-89) en la inmunotoxicidad del gluten en los pacientes celíacos. Los epítomos del gluten con elevada inmunogenicidad están localizados en regiones de las gliadinas ricas en residuos de prolina y glutamina (Shan et al., 2002; Tye-Din et al., 2010; 10 Comino et al., 2011; Real et al., 2012; Dessi et al., 2013).

El estricto cumplimiento de una dieta sin gluten (DSG) es el único tratamiento efectivo a día de hoy para la EC y otros casos de intolerancias al gluten. En la mayoría de los pacientes, el cumplimiento estricto de una DSG conduce, en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de la arquitectura normal y la función de la mucosa del 15 intestino delgado, así como la remisión de los síntomas y la normalización de las pruebas serológicas (Bernardo and Peña, 2012; Hall et al., 2013). Por tanto, la monitorización de la adherencia en los pacientes celíacos es de vital importancia para evitar los daños acumulativos directos o indirectos así como también para confirmar que la persistencia de cualquier sintomatología no se debe a una infracción (voluntaria 20 o no) de la dieta.

El seguimiento de la DSG supone numerosas restricciones debido a sus implicaciones sociales y económicas. Aproximadamente más de la mitad de los alimentos que se comercializan a día de hoy contienen gluten de trigo, cebada, centeno o avena, incluyendo aquellos en los que sólo interviene como espesante o 25 aglutinante (Freeman, 2013). El incumplimiento de la DSG se ha asociado con diarreas, dispepsia, osteoporosis, anemia por deficiencia de hierro, depresión e infertilidad, síntomas que desaparecen o mejoran, en cierta medida mediante la adhesión a la DSG. De hecho, la falta de adherencia a una DSG de manera estricta puede aumentar 4,3 veces las posibilidades de sufrir un linfoma (Lebwohl and Green, 30 2003). Estas observaciones nos dan una idea de la importancia de la adherencia a una DSG para reducir los síntomas, evitar deficiencias nutricionales y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, varios estudios basados en biopsias intestinales han sugerido que al menos un tercio de los pacientes con EC no se adhieren plenamente a la DSG (Ciacci et al., 2002; Silvester and Rashid, 2007; Barratt et al, 2011; Matoori et 35 al., 2013). Además, entre un 36% y 55% de los pacientes que tienen plena adhesión a

la DSG no alcanzan la remisión histológica completa, probablemente debido a ingestas involuntarias de gluten (Tio et al., 2012; Stoven et al, 2012; Hall et al., 2013; Matoori et al., 2013). No obstante, la exposición de estos pacientes al gluten a través del consumo de alimentos etiquetados como seguros pero que contienen trazas de gluten, no podría explicar el alto número de pacientes en los que no hay remisión completa de los daños histológicos de la mucosa (Koning et al., 2013).

Así mismo, existe una parte de la población celíaca que no parece responder de manera positiva a la DSG y sufren síntomas de malabsorción persistente o recurrente y atrofia de las vellosidades intestinales. Esta población podría ser sospechosa de padecer EC refractaria (ECR), una enfermedad rara (aproximadamente el 5%-10% de los pacientes con EC) que aparece en los pacientes sin aparente respuesta positiva a la DSG (Al-Toma et al., 2007; Freeman, 2009; Rubio-Tapia and Murray, 2010). Aunque la ECR fue descrita en pacientes con supuesta ausencia total de ingesta de gluten, la ingestión involuntaria y la hipersensibilidad a una pequeña cantidad de gluten también pueden desencadenar los síntomas propios de la patología.

Existe un porcentaje elevado de celíacos (aproximadamente un 90%) que declaran que durante la semana tienen algún síntoma de haber ingerido gluten (Lähdeaho et al., 2014). En algunos casos de diarrea aguda por ejemplo, existen dudas entre los clínicos a la hora de identificar si las causas provienen de una infección aguda o de haber ingerido gluten. La única herramienta disponible en este último caso es identificar el agente infeccioso, lo cual puede ser complejo dada la cantidad de microorganismos causantes y el precio y tiempo en el desarrollo del análisis microbiológico.

Actualmente para la evaluación del cumplimiento de la DSG de los pacientes celíacos existen algunos marcadores disponibles entre los que se incluyen la observación de la mejora sintomática, entrevista dietética y reducción o normalización de anticuerpos específicos para la EC tales como anti-transglutaminasa tisular (ATT) o péptidos del gluten anti-desamidados (ADG) (Dipper et al., 2009; Vives- Pi et al., 2013; Vallejo et al., 2013; Sharkey et al., 2013). Sin embargo, no hay consenso en cuanto a la periodicidad de realización de los controles ni cuáles son las mejores medidas para evaluar dicho cumplimiento, además de que algunos de estos métodos han demostrado limitaciones significativas (Bai et al., 2012). El control con los anticuerpos ATT o ADG han sido propuestos como marcadores, sin embargo por lo general se vuelven negativos al año de comenzar la DSG además de que no implican la curación completa de la mucosa intestinal (Tursi et al, 2003; Sharkey et al., 2013). Este tipo de

marcadores son útiles en la verificación de la no adherencia más que en la comprobación del estricto cumplimiento de la DSG. Por tanto, los métodos serológicos podrían no ser suficientemente sensibles para detectar transgresiones dietéticas ocasionales y que impiden la recuperación completa (Kaukien et al., 2002; 2007; Tursi et al., 2006). No son, por tanto, una manera directa de demostrar la ingesta de gluten y así evitar secuelas nocivas, de hecho, solo se pueden medir las consecuencias de las transgresiones dietéticas observando la inflamación de las mucosas y/o la atrofia vellositaria para lo cual se tendrían que realizar biopsias intestinales y como consecuencia anestesiar al paciente con los posibles riesgos, molestias y gastos médicos que conlleva.

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

Trabajos previos han puesto de manifiesto que los anticuerpos monoclonales anti-33 mer G12 y A1, obtenidos frente al principal epítipo inmunogénico de la gliadina, son muy útiles en la detección de péptidos tóxicos de gluten tanto en investigación clínica como en la alimentaria (Morón et al., 2008a; 2008b; Ehren y col., 2009; Comino et al., 2012). Recientemente se ha propuesto la determinación de los péptidos del gluten en las heces como una estrategia para la verificación directa del cumplimiento de la DSG. Los ensayos basados en los anticuerpos G12 y A1 han permitido la detección de los péptidos derivados del gluten que son excretados en las heces humanas con cierta correlación con la cantidad del gluten ingerido (Comino et al., 2012). La monitorización del gluten digerido en las heces en un grupo de voluntarios sometidos a una estricta DSG indicó que una única ingesta de gluten puede ser detectada mediante medición de dichos péptidos reactivos en heces, pudiendo determinarse su excreción entre 2-4 días, sin ingesta de gluten adicional.

Algunos síntomas extraintestinales de la EC tales como dermatitis herpetiforme, anemia, osteoporosis, trastorno neurológicos, etc., son difíciles de explicar sin asumir la presencia de péptidos en la sangre después de la ingesta de gluten en los pacientes

celiacos (Chirido et al., 1998; Stern et al., 2001; Riestra, 2008; Ludvigsson and Green, 2011). Por tanto, las herramientas más convenientes para saber cuándo se infringe una DSG son por tanto aquellas que detectan directamente la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten en muestras humanas, ya que la presencia de estos péptidos en un enfermo celíaco sería la forma más directa e inequívoca para determinar si el individuo ha ingerido o no gluten.

Hasta la fecha, disponemos de escasos recursos directos para controlar el cumplimiento de la dieta en estos pacientes. La detección en heces de péptidos del gluten tiene el inconveniente de que el manejo de las muestras es incómodo y se detecta solo a partir de las 24 horas desde la ingestión y requiere un proceso extractivo de los péptidos inicial. Las muestras de orina presentan un gran atractivo por su facilidad de toma de muestra, no invasividad, simple manipulación, fácil homogeneización, bajo costo y fácil transporte y almacenamiento (Esteban and Castaño, 2009; Pinches et al, 2012; Li et al, 2013). Los péptidos y pequeñas proteínas (< 10 kDa) se filtran libremente por el glomérulo (Pisitkun et al., 2006). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de los péptidos de bajo peso molecular o fragmentos de proteínas contenidas en la orina debido a la dificultad técnica de la medición de péptidos en presencia de proteínas en muestras diluidas y la gran diversidad de péptidos esperada.

En la presente invención, se indica cómo pueden detectarse péptidos inmunogénicos de gluten (GIPs) en muestras de fluidos humanos, preferentemente en orina de individuos sanos y celíacos mediante concentración de péptidos de la orina y detección con tiras inmunocromatográficas anti-33-mer, pudiendo ser aplicado en estudios clínicos y de seguimiento de la DSG así como también, en el diagnóstico de la ECR.

Akobeng AK, Thomas AG. 2008. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 27:1044-1052.

Alaedini A, Green P. 2005. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Am. College Phys*; 142: 289-298.

Al-toma A, Verbeek WH, Mulder CJ. 2007. The management of complicated celiac disease. *Dig Dis*; 25:230-236.

Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KE, Sollid LM. 2004. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Medic*; 1:84-92.

Bai J, Zeballos E, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing MJG, Catassi C, Greco L, Cohen H, Krabshuis JH. 2012. WGOOMGE Practice Guideline Coeliac Disease. *World Gastroenterol News*; 2: S1-S8.

5 Barratt SM, Leeds JS, Sanders DS. 2011. Quality of life in coeliac disease is determined by perceived degree of difficulty adhering to a gluten-free diet, not the level of dietary adherence ultimately achieved. *J Gastrointest Liver Dis*; 20:241-245.

Bernardo D, Peña AS. 2012. Developing strategies to improve the quality of life of patients with gluten intolerance in patients with and without coeliac disease. *Eur J Intern Med*; 23:6-8.

10 Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, et al. 2007. A prospective, double blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*; 85:160-166.

Catassi C, Fasano A. 2008. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*; 24:687-691.

15 Chirido FG, Rumbo M, Añón MC, Fossati CA. 1998. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol*; 33:1186-92.

20 Ciacci C, Cirillo, M, Cavallaro R, Mazzacca G. 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. *Digestion*; 66:178-185.

Comino I, Real A, de Lorenzo A, Cornell H, López-Casado MA, Barro F, Lorite P, Torres MI, Cebolla A, Sousa C. 2011. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*; 60: 915-922.

25 Comino I, Real A, Vivas S, Síglez MÁ, Caminero A, Nistal E, Casqueiro J, Rodríguez-Herrera A, Cebolla A, Sousa C. 2012. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*; 95:670-677.

30 Dessì M, Noce A, Vergovich S, Noce G, Daniele N. 2013. Safety Food in Celiac Disease Patients: A Systematic Review. *Food and Nutrition Sciences*; Vol. 4 No. 7A:55-74.

- Dipper CR, Maitra S, Thomas R, Lamb C A, McLean-Tooke A P, Ward R, Smith D, Spickett G, Mansfield JC. 2009. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. Anti-tissue Transglutaminase Antibodies in the Follow-up of Adult Coeliac Disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 30:236-244.
- 5 Ehren J, Morón B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. 2009. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One*; 21:e6313.
- Esteban M, Castaño A. 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int*; 35:438-449.
- Fasano A. 2009. Surprises from celiac disease. *Sci Am*; 301:54-61.
- 10 Freeman HJ. 2009. Adult celiac disease and its malignant complications. *Gut Liver*; 3:237-246.
- Freeman HJ. 2013. Non-dietary forms of treatment for adult celiac disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*; 4:108-112.
- Ganapathy V, Gupta N, Martindale RG. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4th ed. New York, NY: Johnson LR, 2006.
- 15 Gibert A, Kruijzinga A G, Neuhold S, Houben G F, Canela M A, Fasano A, Catassi C. 2013. Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr*; 97:109-116.
- 20 Hall NJ, Rubin GP, Charnock A. 2013. Intentional and inadvertent non-adherence in adult coeliac disease. A cross-sectional survey. *Appetite*; 68:56-62.
- Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, Troncone R, Ward R. 2006. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 23:559-575.
- 25 Kagnoff F. 2007. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128:4, S10-S18.
- Kaukinen K, Peraaho M, Lindfors K, et al. 2007. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in celiac disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 25:1237-1245.

- Kaukinen K, Sulkanen S, Maki M, et al. 2002. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 14:311-315.
- 5 Koning F, Mol M, Mearin M L. 2013. The million-dollar question: is “gluten-free” food safe for patients with celiac disease? *Am J Clin Nutr*; 97:3-4.
- Kunachowicz H. 2001. Wartość odżywcza produktów i potraw. In: Kunachowicz H. (ed.): *Dieta bezglutenowa co wybrać?* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 9-25.
- 10 Lähdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Kärjä-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman DC, Mäki M. 2014. Glutenase ALV003 Attenuates Gluten-Induced Mucosal Injury in Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology*; 146:1649-1658.
- Lebwohl B, Green PH. 2003. Screening for celiac disease. *N Engl J Med*; 349:1673-1674.
- 15 Li PKT, Burdmann EA, Mehta RL. 2013. Acute kidney injury: Global health alert. *Transplantation*; 5: 653-657.
- Lionetti E, Catassi C. 2011. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol*; 30:219-31.
- Ludvigsson JF, Green PH. 2011. Clinical management of coeliac disease. *J Intern Med*; 269: 560-571.
- 20 Matoori S, Fuhrmann G, Leroux JC. 2013. Celiac disease: a challenging disease for pharmaceutical scientists. *Pharm Res*; 30:619-626.
- Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC, Cebolla A, Khosla C, Sousa C. 2008a. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* 3:e2294.
- 25 Morón B, Cebolla A, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas M del C, López MC, Sousa C. 2008b. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat
- 30 peptide. *Am J Clin Nutr*; 87:405-414.

- Pinches M, Betts C, Bickerton S, Burdett L, Thomas H, Derbyshire N, Jones H B, Moores M. 2012. Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol Pathol*; 40:522-33.
- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. 2006. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*; 5:1760-1771.
- Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchán F, Gil-Humanes J, Giménez MJ, López-Casado MÁ, Torres MI, Cebolla Á, Sousa C, Barro F, Pistón F. 2012. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One*; 7:e48365.
- 10 Real A, Comino I, Moreno ML, López-Casado MA, Lorite P, Torres MI, Cebolla A, Sousa C. 2014. Identification and in Vitro reactivity of Riestra, S. 2008. *Enfermedades asociadas*. Polanco I. (ed.) en *Libro blanco de la Enfermedad Celiaca*, Madrid, España, pp. 41-49.
- Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan E L, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton LJ, Murray JA. 2009. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*; 137:88-93.
- 15 Rubio-Tapia A, Murray JA. 2010. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*; 59:547-57.
- Rujner J. 2002. Celiakia (choroba trzewna). In: Rujner J., Cichańska B.A. (eds.): *Dieta bezglutenowa i bezmleczna dla dzieci i dorosłych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa: 9-22.
- 20 Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*; 10:13.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Gray G M, Sollid L M, Khosla C. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*; 297: 2275-2279.
- 25 Sharkey L M, Corbett G, Currie E, Lee J, Sweeney N, Woodward J M. 2013. Optimising delivery of care in coeliac disease-comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther*; 38:1278-1291.
- 30 Silvester JA, Rashid M. 2007. Long-term follow-up of individuals with celiac disease: an evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol*; 21:557-564.

- Stern M, Ciclitira PJ, Van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. 2001. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13:741-747.
- 5 Stoven S, Murray JA, Marietta E. 2012. Celiac disease: advances in treatment via gluten modification. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 10:859-862.
- Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. 2010. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 7:204-213.
- 10 Tio M, Cox MR, Eslick GD. 2012. Meta-analysis: coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*; 35:540-551.
- Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. 2003. Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*; 37:387-391.
- 15 Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G M et al. 2006. Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a glutenfree diet: a 2-year prospective study. *Endoscopy*; 38:702-707.
- 20 Tye-Din JA, Stewart JA, Dromey JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Henderson K, Mannering SI, Gianfrani C, Jewell DP, et al. 2010. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*; 2:41ra51.
- Vallejo-Diez S, Bernardo D, Moreno Mde L, Muñoz-Suano A, Fernández-Salazar L, Calvo C, Sousa C, Garrote JA, Cebolla A, Arranz E. 2013. Detection of specific IgA antibodies against a novel deamidated 8-mer gliadin peptide in blood plasma samples from celiac patients. *PLoS One*; 22:e80982.
- 25 Vives-Pi M, Takasawa S, Pujol-Autonell I, Planas R, Cabre E, Ojanguren I, Montraveta M, Santos AL, Ruiz-Ortiz E. 2013. Biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Gastroenterol*; 47:308-313.

Descripción de las figuras

- 30 - *Figura 1. Relación de la concentración de los patrones de gliadina con la intensidad de la señal cuantitativa del lector de tiras IC. El valor medio de la intensidad,*

desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD) se calculó para cada patrón estándar. La función Rodbard fue calculada mediante la utilización del software del Reader con los parámetros incluidos en la tabla.

5 - *Figura 2. Cinética de eliminación y aparición de GIPs en muestras de orina de individuos sanos (n=13) sometidos a una dieta controlada de gluten.* Semicuantificación de péptidos/proteínas de gluten mediante tiras inmunocromatográficas con anticuerpo G12 en las muestras de orina de individuos sanos que tras consumir una DCG se sometieron a DSG hasta que los péptidos reactivos del gluten se volvieron indetectables. Tras esto, se sometieron a una DCG
10 para comprobar la aparición nuevamente de GIPs en las muestras de orina. Se recogieron entre 3 y 6 muestras de orina al día de cada individuo durante cuatro días. A) Ejemplo representativo de la colección de tiras IC reaccionando con muestras de orina de un individuo que intervino en el estudio (aH6). La franja azul es un control interno positivo que indica que el dispositivo ha funcionado correctamente, y la franja
15 rosa indica la presencia de péptidos del gluten. B) Cinética de excreción de GIPs de 4 individuos sanos (aH1-aH12). GIPs, péptidos inmunogénicos del gluten; DCG, dieta normal con gluten; DSG, dieta sin gluten.

20 - *Figura 3. Monitorización in vivo de la excreción urinaria de los péptidos derivados del gluten de individuos sanos tras ingestas controladas de gluten.* Se administraron tres dosis de gluten (10, 25 y 50 mg) a individuos sanos que estuvieron consumiendo una DSG durante 1 semana. Se muestran 4 experimentos independientes correspondientes a muestras medidas por triplicado para las ingestas de 25 y 50 mg de gluten de 4 individuos sanos. GIPs, péptidos inmunogénicos del gluten; DSG, dieta sin gluten.

25 - *Figura 4. Monitorización de la adherencia a la DSG de los pacientes celíacos mediante detección y cuantificación de GIPs en muestras de orina.* Los pacientes celíacos incluidos en el estudio seguían una DSG > 2 años y los individuos sanos que participaron como controles positivos consumieron una DCG. Los participantes fueron divididos en dos grupos según edades: adultos (>16 años) y niños (0-15 años). Cada
30 punto representa el valor medio de absorbancia (DO de 450 nm) de la muestra de orina analizada de cada individuo. De acuerdo con el límite de cuantificación de la técnica (LQ=0,8 ng/ml, línea señalada), los individuos con un valor de GIPs superior o igual al LQ se consideraron positivos para la presencia de GIPs, mientras que aquellos con contenido en GIPs menor que el LQ fueron considerados negativos. * p <0,0001

(test de Student). GIPs, péptidos inmunogénicos del gluten; DSG, dieta sin gluten; DCG, dieta normal con gluten; LQ, límite de cuantificación.

Descripción de la invención

5

La presente invención muestra un procedimiento para la monitorización no invasiva de la adherencia a la dieta libre de gluten mediante la detección y cuantificación de los péptidos inmunogénicos del gluten resistentes a la digestión gastrointestinal en fluidos humanos y de forma preferente en orina. La presencia o ausencia de los péptidos inmunogénicos del gluten resistentes a degradación enzimática intestinal es detectada por ensayos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a los mismos. La reactividad frente a tales péptidos se puede señalar mediante técnicas inmunológicas variadas que incluyen la inmunocromatografía, biosensores, ensayos ELISA, detección con partículas magnéticas, etc. Si el fluido humano tiene poca concentración de péptidos del gluten, el procedimiento puede requerir como paso previo al ensayo inmunológico la concentración de los péptidos inmunogénicos mediante paso del fluido a través de unas columnas. Esta metodología es aplicable en el sector médico-clínico, tanto en la verificación del cumplimiento de la dieta libre de gluten de los pacientes celíacos, pacientes con sensibilidad alérgica o en pacientes con cualquier tipo de sensibilidad a las proteínas del gluten, así como en el diagnóstico preciso de la enfermedad celíaca refractaria, es decir, en aquellos casos donde persisten los síntomas a pesar la supuesta ausencia total de ingesta de gluten. También puede aplicarse la invención en investigación clínica de la enfermedad celíaca para comprobar la eficacia de futuras estrategias relacionadas con la eliminación o disminución de la toxicidad del gluten.

La presente invención tiene como objeto la aplicación de técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos que reconocen péptidos inmunogénicos derivados del gluten y resistentes a degradación intestinal en muestras de fluidos humanos. En una realización preferente de la invención el uso de la orina como muestra al permitir disponer de mayores volúmenes que de saliva, sudor, suero, etc., facilitando por tanto el trabajo de recogida de las muestras. La aplicación preferente de la invención es la detección de la ingestión de gluten en pacientes que son diagnosticados y monitorizados por tener alguna sensibilidad al gluten. Tiene una aplicación preferente en la verificación de la ingesta de gluten durante el diagnóstico de la EC, en la comprobación del cumplimiento de la DSG de los pacientes celíacos ya

diagnosticados, así como en la detección de un caso de potencial intoxicación por gluten en cualquier paciente con sensibilidad al gluten inmunotóxico. La invención se basa en emplear preferentemente técnicas inmunológicas que usan anticuerpos que reconocen los péptidos del gluten inmunotóxicos y resistentes a la digestión gastrointestinal.

El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, a moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el péptido de la invención. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitación, tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Otro ejemplo de seleccionar las porciones activas de inmunoglobulinas conocidas en el estado de la técnica se realizan mediante técnicas de ingeniería genética usando las regiones variables de las inmunoglobulinas.

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

El anticuerpo de la invención puede ser quimérico. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la reactividad deseada.

Son de uso preferente los anticuerpos monoclonales A1 y G12 obtenidos por reactividad frente al 33-mer de la alfa-gliadina del trigo, aunque otros anticuerpos que

reconocen péptidos resistentes a digestión del gluten como el R5 o anticuerpos anti 8-mer de la omega-gliadina podrían usarse. Una forma preferente de realizarse la detección de los péptidos del gluten podría ser mediante pruebas de flujo lateral (lateral flow test) con inmunocromatografía. El método de la invención debería
5 idealmente permitir detectar en orina una ingesta de gluten puntual equivalente a 50 mg de gluten de trigo por día, que es una cantidad situada en el rango máximo descrito para una DSG, o en su caso un mínimo de 6.48 ng de péptidos inmunogénicos de gluten (GIPs,) /ml de orina.

La detección y/o cuantificación de los péptidos en fluidos humanos se puede
10 llevar a cabo mediante ensayos inmunológicos, por ejemplo, aunque sin limitación, por inmunocromatografía con tiras de flujo lateral, inmunoprecipitación, separación inmunomagnética, arrays de proteína, inmunofluorescencia por detección por partículas fluorescentes en citometría de flujo, biosensores electroquímicos, biosensores de resonancia de plasma (ejemplo: BIACORE®™), termoeléctricos,
15 nanomecánicos, ópticos y en definitiva, cualquier técnica inmunológica conocida que sea suficientemente sensible y específica para garantizar la detección y, preferentemente la cuantificación de los péptidos del gluten. Es objeto preferente de la presente invención kits o dispositivos analíticos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a péptidos del gluten presentes en orina los cuales han demostrado
20 ser resistentes a digestión gástrica e inmunogénicos. Probablemente estos péptidos podrían pasar al sistema sanguíneo y posteriormente ser excretados, entre ellos estarían los péptidos reconocidos por los anticuerpos A1 y G12 (Morón et al. 2008b).

Dichos procedimientos y kits analíticos tienen también su objeto en la invención en su uso para revelar que se ha consumido gluten, ya sea por la contaminación de
25 los alimentos consumidos, por una mala praxis en la manipulación de alimentos, o por una ingesta voluntaria/involuntaria ocasional de alimentos que contienen gluten. Además, es objeto de la presente invención la aplicación de la detección de dichos péptidos inmunotóxicos en muestras de orina con fines en investigación clínica sobre la EC, para comprobar la eficacia de futuras terapias relacionadas con la disminución o
30 eliminación de la toxicidad del gluten entre las que se encuentran las terapias enzimáticas con prolil-endopeptidasas, la eliminación de las prolaminas del gluten de los granos de cereales, las terapias secuestrantes de péptidos inmunotóxicos, la detoxificación de los péptidos del gluten nocivos en los alimentos elaborados y otras terapias alternativas.

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

Es objeto de la presente invención el uso de técnicas inmunológicas para dicha detección de gluten en orina y otros fluidos humanos. Los métodos inmunológicos podrían ser tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, Western blots, ELISAs, biosensores basados en reacciones electroquímicas catalizadas por enzimas acoplados a los anticuerpos, por partículas magnéticas tapizadas por anticuerpos, por resonancia de plasmones superficiales, otros biosensores ópticos, termoelectrónicos, y demás técnicas en las que se pueda medir la concentración de un analito por un anticuerpo.

En una forma preferente de la invención, estos métodos se caracterizan porque emplean preferentemente al menos un anticuerpo con capacidad para detectar epítomos que contienen en su secuencia al menos un tercio de prolina y un tercio de glutaminas como son las secuencias siguientes: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 así como sustituciones aleatorias de glutamato por glutamina en estos péptidos que podría ocurrir por desaminación mediada por transglutaminasas. En una forma preferente de la invención los anticuerpos usados por las técnicas inmunológicas serían el G12 y por extensión el A1, por su demostrada especificidad y sensibilidad. También contempla la invención el uso de otros anticuerpos como el R5 que se suele utilizar en la medida de gluten en alimentos y que reacciona con epítomos similares a la secuencia SEQ ID N° 9 que también puede hallarse en péptidos del gluten resistente a digestión gastrointestinal, aunque con menor especificidad y sensibilidad ante péptidos inmunogénicos similares al péptido 33-mer, podrían tener sensibilidad suficiente al reaccionar péptidos resistentes a proteasas típicas de las prolaminas de los cereales tóxicos para celíacos.

Una forma preferente de la invención sería el empleo de tiras inmunocromatográficas basadas en los anticuerpos anti-33-mer de la α -gliadina, G12 y A1, que permiten una detección semicuantitativa y rápida de los péptidos/proteínas del gluten contenidos en las muestras de orina.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso particular de métodos inmunológicos basados en el anticuerpo monoclonal G12 y A1 conjugado a un enzima que permita un ensayo cuantitativo usando sustratos cromogénicos, fluorogénicos o luminiscentes. Este procedimiento podría usar un patrón de gliadina, gliadina hidrolizada, el péptido 33-mer completo (SEQ ID N° 1) o una parte de su secuencia de al menos 8 aminoácidos.

La invención propone la detección del gluten ingerido por un individuo mediante la cuantificación de los péptidos inmunogénicos del gluten excretados en la orina y en otros fluidos humanos como la saliva, el sudor o el suero.

La invención propone un método analítico de control para la verificar si se cumple la DSG, así como también para descartar la ingesta no controlada de gluten en los pacientes sospechosos de sufrir la llamada EC refractaria.

Es parte de la invención aplicar el método en la comprobación de la eficacia de las estrategias terapéuticas que reducen o eliminan la toxicidad del gluten mediante la desintoxicación enzimática del gluten (por ejemplo Alvine Pharmaceuticals Ltd., EEUU; o DSM, Holanda), mediante secuestro de las prolaminas tóxicas por polímeros para evitar su hidrólisis (por ejemplo, BiolineRX, Israel) u otras terapias alternativas. También podrán ser controladas las muestras de orina de los pacientes celíacos sometidos a ensayos clínicos o a una prescripción terapéutica en el futuro, ya que la efectividad de la terapia se podría determinar midiendo la presencia o ausencia de péptidos en orina en las siguientes horas de la ingesta de alguna cantidad controlada de gluten junto con las terapias que eliminan los péptidos inmunotóxicos, o bien tras la ingesta de alimentos tratados con alguna metodología que evite que los péptidos inmunotóxicos se internalicen en el individuo.

La falta de consenso actual en la práctica clínica sobre cómo llevar el control de la DSG y la determinación de casos de exposición involuntaria al gluten por contaminación de los alimentos podrían ser resueltos con simples ensayos inmunológicos de las muestras de orina. Los profesionales sanitarios podrían considerar útiles estos métodos para el seguimiento de los pacientes celíacos y en el diseño de futuros ensayos clínicos con el fin de establecer conclusiones coherentes sobre el estado de la enfermedad del paciente.

En una realización preferente de la invención, se realiza una preconcentración de los péptidos en las muestras de orina mediante un sistema de extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE), por unión fisicoquímica de los péptidos a la matriz

de forma reversible y posterior desunión de los mismos tras elución con una solución de composición adecuada que permite despegar los péptidos de la matriz. También pueden concentrarse por interacción con anticuerpos específicos inmovilizados en las resinas cromatográficas o en partículas magnéticas.

5 Posteriormente los polipéptidos del gluten concentrados se eluyen con un volumen inferior de una solución adecuada compatible con la posterior cuantificación mediante las tiras inmunocromatográficas que usen al menos un anticuerpo anti-péptidos de prolaminas, preferentemente aquellos reconocidos por los mencionados A1 y G12, pero no limitados a éstos. Para poder cuantificar la cantidad de péptido, el
10 procedimiento se podría completar usando unos patrones de referencia con proteínas del gluten intactas, o preferentemente, polipéptidos del gluten hidrolizados por pepsina y tripsina o bien sintetizados. La intensidad de señal de cantidades conocidas de péptido patrón serviría para extrapolar la cantidad de péptido en la muestra realizando una recta patrón.

15

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Concentración, detección y semicuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten en orina utilizando tiras inmunocromatográficas.

En el presente ejemplo de realización se muestra cómo pueden detectarse y
20 cuantificarse en orina los péptidos inmunogénicos del gluten, a pesar de la esperada digestión gastrointestinal, tras un proceso de preconcentración. El gluten es una mezcla compleja de proteínas que comprenden las gliadinas y gluteninas en trigo y proteínas equivalentes en la cebada, centeno y en algunas variedades de avena. Las gliadinas y gluteninas tienen una composición única de aminoácidos con un alto
25 contenido de prolina (15%), aminoácidos hidrofóbicos (19%) y glutamina (35%); por lo tanto, forman una estructura resistente para completar la digestión por proteasas pancreáticas. Tras la reciente demostración de que las tiras inmunocromatográficas anti 33-mer de la α -gliadina, basadas en los anticuerpos G12 y A1, pueden detectar con gran sensibilidad los péptidos de gluten hidrolizado a partir de muestras de heces
30 y cervezas (Comino et al, 2012; Real et al., 2014 en prensa), se planteó si los péptidos del gluten también se excretan en la orina.

En primer lugar se llevó a cabo un ensayo en el cuál se obtuvieron muestras de orina de individuos sanos que llevaban una dieta normal que contenía gluten (DCG) (n=10). Dado que es esperable que los péptidos del gluten estén en muy bajas

concentraciones en la orina, consideramos llevar a cabo una etapa de pre-concentración que posiblemente también elimine potencial material de interferencia y así se mejoren las posibilidades de detección de GIPs. Los individuos voluntarios fueron divididos en dos grupos, un grupo (n=10) recibió una dieta no estandarizada en la que el gluten se consumió diariamente, y otro grupo (n=10), se sometió a DSG durante una semana. Se obtuvo consentimiento escrito de los individuos participantes. Para la realización del estudio se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- **Dieta:** Todos los sujetos participantes en el estudio fueron instruidos para cumplir con la dieta establecida. Así, los que consumieron DCG, recibieron asesoramiento de la dieta con alimentos con gluten y los de la DSG recibieron instrucciones de los alimentos permitidos. Al final del estudio, el cumplimiento de las condiciones de alimentación se determinó a través de una entrevista estructurada.

- **Toma de muestras de orina:** Se recogieron las muestras de orina de los sujetos participantes en el estudio en tubos Falcon estériles y posteriormente fueron envasados y almacenados a -20°C hasta su análisis. Todas las muestras fueron homogeneizadas y alicuotadas en menos de 3 horas después de la micción.

- **Concentración de los péptidos en las muestras de orina:** Para concentrar los péptidos y eliminar las impurezas de las muestras de orina recogidas se utilizó la técnica SPE. Los cartuchos de octadecilsilano utilizados se acondicionaron previamente con 1 ml de ácido fórmico al 0,1% en 80% de metanol mediante la aplicación de vacío y se desechó el eluyente. Posteriormente, se añadieron 7,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y después del vacío el eluyente se descartó. Por separado, una mezcla de 5 ml de 50% de orina en TFA se centrifugó 10 min a 2500 g. y los péptidos concentrados de interés se eluyeron con 1 ml de solución tampón PBS compatible con las tiras Glutentox.

Tras concentración de las muestras de orina de todos los voluntarios sanos (n=20) utilizando cartuchos SPE posteriormente, se llevó a cabo la detección de GIPs en las muestras de orina de los individuos incluidos en los dos grupos de dieta diferentes utilizando las tiras inmunocromatográficas Glutentox Sticks (Biomedal S.L., Sevilla, España). Los péptidos del gluten se detectaron en todas las orinas concentradas de los sujetos en DCG. Sin embargo, en las personas en DSG, no detectamos péptidos tóxicos del gluten en ninguna orina concentrada. Estos resultados indican que la señal fue dependiente de la ingesta de gluten.

Para correlacionar la concentración de GIPs y la señal de salida de las tiras inmunocromatográficas analizadas, el lector de tiras fue calibrado con un estándar de péptido sintético 33-mer de la α -gliadina y con orina de un paciente que llevaba más de 2 años en DSG al cuál se les analizaron los marcadores serológicos para confirmar la estricta adherencia a la dieta. Para verificar la ingesta de gluten negativa de la paciente, se realizó un análisis cualitativo mediante el uso de los anti-GIPs Glutentox-strips que tienen anticuerpos G12, en concentrados de orina y en heces de acuerdo con el protocolo establecido por Comino et al (2012). Se prepararon una serie de 5 estándares del péptido 33-mer a 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100 y 200 ng/ml y se añadió la orina control, recogiénose el valor de la altura máxima de la línea de las tiras IC que se evaluó con el Lector Glutentox Reader® (Biomedal S.L., Sevilla, España). Se calculó el valor medio en cada estándar, así como su desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD). Se utilizaron los valores medios para el cálculo de la función de calibración que se ajusta a una función Rodbard (Figura 1). A continuación, la función de calibración se introdujo en el software del lector de IC-banda anti GIP para cuantificar GIPs en muestras de orina. El límite de cuantificación (QL) de la técnica fue establecido en 6,48 ng GIPs / ml de orina.

Una vez confirmada la viabilidad del método para la detección del gluten en la orina, se llevó a cabo un ensayo con la finalidad de semicuantificar el nivel de GIPs en las muestras de orina. Para ello se llevó a cabo un ensayo en el que se comprobó por entrevista dietética que el gluten había sido consumido por los individuos sanos participantes en el estudio (n=10, 7 mujeres y 3 hombres, edad media 23-39 años). Los criterios de inclusión comprendieron la ausencia de enfermedades, síntomas digestivos, medicamentos, antibióticos en los últimos dos meses y ausencia de historia familiar de EC. Todos los participantes fueron evaluados para la EC, mostrando niveles de tTG sérica normales y su fenotipo HLA-DQ no fue DQ-2/-8. Los niveles de hemoglobina y el análisis de bioquímico de sangre, incluyendo las pruebas renales y hepáticas, se encontraron incluidas en el rango de los valores normales. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético local del “Hospital Virgen de Valme” (Sevilla, España). Se obtuvo consentimiento escrito de los individuos participantes. Se llevó a cabo la toma de muestra de orinas de los individuos que mantenían una dieta normal en la que estaba presente el gluten (pan, pasta, galletas, etc.). La presencia de péptidos derivados del gluten en los extractos concentrados de orina se determinó usando tiras inmunocromatográficas (IC, Glutentox Sticks) basadas en el anticuerpo G12 mediante lectura de la intensidad de la señal con un lector de tiras Glutentox Reader®. Las muestras fueron sumergidas en la solución de dilución propuesta por el

fabricante. Las tiras inmunocromatográficas se sumergieron en las distintas muestras (300 µl) durante 10 min y se dejaron secar al aire. En este caso, todos los individuos presentaron una excreción de péptidos del gluten en orina con valores por encima de 20 ng/ml.

5

Ejemplo 2. Monitorización de péptidos inmunogénicos derivados del gluten en muestras de orina de individuos durante una dieta controlada de gluten.

En el presente ejemplo se muestra cómo se puede determinar el tiempo de eliminación y aparición del gluten ingerido en muestras de orina utilizando tiras IC basadas en el anticuerpo G12. Para ello, un total de 13 voluntarios sanos (9 mujeres y 4 hombres, edad media 23-65 años) fueron sometidos a diferentes condiciones dietéticas. Se recogieron muestras de orina de dichos individuos que consumían una DCG y fueron sometidos a una dieta sin gluten (DSG) hasta que el nivel de GIPs se hizo indetectable en las muestras de orina. Tras esto, una DCG fue reintroducida y se recogieron nuevamente las muestras de orina. Un total de 3-6 diferentes muestras de orina de cada uno de los individuos se recogieron al día. La Figura 2A muestra un ejemplo representativo de la colección de tiras IC reaccionando con muestras de orina recogidas durante el periodo de estudio de un sujeto sano (AH6). Las cinéticas de excreción de GIPs de 4 de los 13 voluntarios sanos (AH1, AH5, AH8 y AH12) analizados, revelan que el gluten consumido se elimina completamente entre las 16-34 horas posteriores al comienzo de la DSG en todos los individuos ensayados (Figura 2B).

Tras la reintroducción del gluten de la dieta se detectaron GIPs en muestras de orina a las 3-9 horas. Las diferencias observadas en la excreción entre individuos podrían relacionarse con la dieta, el tipo de alimentos que contienen gluten, y la variabilidad en la capacidad hidrolítica del sistema digestivo (principalmente enzimas) y las actividades microbianas. En 12 de los 13 individuos sanos en DSG, las cantidades de GIPs en orina estaban por debajo del QL del método. El resto de los pacientes tuvieron una buena adherencia a la DSG inicialmente; sin embargo se detectó en uno de ellos una señal de 40 ng GIPS /ml orina al tercer día de la prueba, como se muestra en el gráfico del individuo AH12. Al ser entrevistado al final del estudio, este individuo confirmó el consumo involuntario de yogur con cereales (trigo, entre otros) unas horas antes de una de las recogidas de orina.

Tras el consumo de gluten se observó una gran variabilidad en la concentración y el tiempo para la excreción de péptidos reactivos de gluten entre individuos. Una vez confirmada la viabilidad del método para la detección del gluten en la orina, estudiamos si existía correlación entre la cantidad de gluten ingerida y la cantidad de GIPs medidos en la orina con esta metodología. De acuerdo con recientes revisiones sistemáticas, un consumo diario total de gluten inferior a 10-50 mg de gluten puede causar anormalidades histológicas (Hischenhuber et al, 2006; Catassi et al, 2007; Akobeng y Thomas, 2008; Gibert et al., 2013). Para probar si la metodología anti-GIPs LFT era capaz de detectar un bajo consumo de gluten en muestras de orina, se fijaron unas cantidades de gluten ingerido (10 a 50 mg) que se administraron a cuatro individuos sanos (Figura 3). Un tipo único de gluten se utilizó en todos los casos. A los individuos se les dio una pieza estándar para excluir la variabilidad debida a la administración de gluten de diferentes fuentes. Una microdosis inicial de 10 mg de gluten se administró y el contenido de gluten se midió en muestras de orina recogidas mediante el uso de anti- GIPs LFT. A continuación, se administraron dosis de 25 y 50 mg y también se midieron cantidades GIPs en orina hasta que los péptidos reactivos de gluten se hicieron indetectables. Tras el consumo de cantidad equivalente de alimento a 50 mg de gluten, se detectaron GIPs en orina en todos los individuos analizados y, por lo tanto, el límite de detección (LD) de este método es de 50 mg de gluten. No obstante, la administración de 25 mg de gluten produjo señales medibles en las tiras IC tras análisis de la orina en 3 de las 4 personas analizadas (AH2, AH4 y AH10), aunque sólo en AH10 la señal fue claramente superior al QL. No hubo señales detectables tras la ingestión de 10 mg en ningún individuo. Las variaciones individuales observadas fueron probablemente debidas a las diferencias individuales de metabolismo y dietas, la microbiota intestinal y las variaciones en el consumo diario de alimentos.

Ejemplo 3. Monitorización de la adherencia a la dieta sin gluten en muestras de orina de pacientes celíacos.

En el presente ejemplo se muestra cómo se puede monitorizar la adherencia a la DSG de los pacientes celíacos mediante la determinación de péptidos inmunogénicos del gluten en orina por un sistema de detección rápido basado en las tiras IC con el anticuerpo G12 (Glutentox Stick, Biomedal, S.L.). El alto porcentaje de pacientes celíacos con recuperación parcial de la mucosa intestinal, probablemente debido a ingestiones involuntarias, ha generado la necesidad de un marcador no invasivo que permita el seguimiento a corto plazo de la adhesión a la DSG. El paso del gluten por el tracto gastrointestinal da lugar a la hidrólisis de la mayor parte de éste. Para evaluar si

el método era adecuado para el seguimiento de la ingestión de gluten en pacientes celíacos, se realizó un estudio en muestras de orina de 76 individuos sanos (42 adultos y 34 niños) que consumían una DCG, y 58 pacientes celíacos en remisión (27 adultos y 31 niños) que habían sido sometidos a DSG durante > 2 años.

5 Las muestras de orina de los individuos sanos tras el consumo de una dieta con gluten presentaron, en todos los casos, niveles de GIPs por encima del LQ del método (76 de 76, 100 % positivos en GIPs en la orina). El rango de valores de GIPs en orina de individuos sanos varió, siendo en adultos de 6,54 a 604 ng/ml orina y en niños de 6,48 a 369 ng/ml orina, es decir, entre 57 y 93 veces por encima del LQ del método, lo
10 que sugiere que la excreción de los péptidos del gluten está fuertemente afectada por la dieta, el tipo de alimentos que contienen gluten, y/o características individuales tales como la microflora intestinal. Cuando se realizó el ensayo en la orina de los pacientes celíacos, el nivel de GIPs en la orina estuvo por debajo del LQ del método sólo en el 41 % de los adultos y en el 55 % de los niños con EC en remisión clínica. En el resto
15 de los individuos celíacos se observó un claro incumplimiento de la DSG, oscilando el contenido en GIPs entre 4,5 y 12 veces por encima del LQ (6,48-78,12 y de 6,48-29,69 ng GIPs/ml de orina, adultos y niños, respectivamente).

Ejemplo 4. Seguimiento de la dieta sin gluten en muestras de orina recogidas durante 24 horas en individuos sometidos a dietas con o sin gluten.

20 En el presente ejemplo se muestra cómo se puede realizar el seguimiento de la DSG en muestras de todas las orinas recogidas durante un día utilizando un sistema de lectura inmunocromatográfico con anticuerpos anti-GIPs. Las sustancias eliminadas por el riñón no se excretan a la misma velocidad o en las mismas cantidades durante diferentes períodos del día y de la noche; en condiciones normales de excreción la
25 eliminación de orina es menor durante la noche que durante el día. Por lo tanto, una muestra de orina al azar podría no generar una imagen integrada de posibles ingestiones puntuales de gluten que tienen lugar durante un día. El análisis de muestras de orina de 24 horas, además de los estudios serológicos, ha sido utilizada por lo general para obtener datos relevantes en muchos trastornos.

30 Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de esta técnica para medir los péptidos derivados del gluten en orina de 24 horas como indicador de la adherencia de la DSG en pacientes celíacos. Para ello, 3 individuos sanos que seguían una DCG y 1 paciente celíaco en remisión con DSG > 2 años participaron en el estudio. Se recogieron separadamente todas las muestras de orina
35 excretadas durante 24 horas de 4 participantes adultos. Cada muestra de orina se

analizó separadamente para determinar su contenido de gluten y, a continuación, se confinaron todas las muestras de orina en un recipiente único. La detección y cuantificación de GIPs por tiras IC se realizó en las 4 muestras de 24 horas. Los 3 sujetos sanos mostraron niveles de GIPs en las muestras de orina individuales así como en la muestra de 24 horas, oscilando el nivel de los péptidos de gluten desde 12,4 hasta 87,6 ng/ml. Sin embargo, las muestras de orina del paciente celíaco estuvieron por debajo del QL del método así como la muestra de 24 horas. Las medidas de GIPs obtenidas en muestras de orina discontinuas fueron muy similares a las obtenidas en las orinas completas 24 horas. Por lo tanto, los resultados indicaron que la medida de gluten en orina de 24 horas proporciona información valiosa sobre el valor promedio del metabolismo y la excreción de gluten consumidos por un día completo en un individuo.

Ejemplo 5. Seguimiento de la dieta sin gluten en muestras de orina mediante un biosensor.

El presente ejemplo muestra cómo es posible la determinación de la cantidad de GIPs en orina mediante la utilización de un biosensor. Es una técnica de detección selectiva y cuantitativa de los péptidos derivados del gluten de forma directa, sin necesidad de marcadores. Para ello, sobre una matriz hidrófoba de 100 nm con un 2% de dextrano se inmoviliza un anticuerpo anti-GIPs. El tampón en el cual se diluye el anticuerpo debe favorecer la interacción electrostática entre éste y la matriz de dextrano de forma que se facilite la formación de enlaces. En medio acuoso, el pKa de los grupos de la matriz es aproximadamente 4. Las concentraciones de anticuerpo para la inmovilización oscilan entre 30 y 130 μ M, aunque dependen del anti-GIPs utilizado. Esta inmovilización genera una señal de resonancia que se recoge en el detector y se denomina señal basal. A continuación, se conduce la orina por encima del chip sensor en estudio. Si ésta contiene GIPs, se genera en el detector un cambio de señal, que es una respuesta directamente proporcional a la interacción entre los GIPs y el anticuerpo. Finalmente, se lava la superficie para eliminar los restos de orina, permaneciendo el anti-GIPs unido. De este modo la superficie está preparada para un nuevo ensayo.

Ejemplo 6. Seguimiento de la dieta sin gluten en muestras de orina mediante un sistema de partículas paramagnéticas y quimioluminiscencia.

El presente ejemplo muestra cómo se puede determinar la presencia de péptidos del gluten en orina usando una partícula recubierta con anticuerpos anti-GIPs. Se inmoviliza un anticuerpo frente a péptido inmunogénico del gluten, el G12, en

partículas magnéticas de 0,2 micras magnéticas. Alrededor de 0,1 mL de partículas magnéticas con una concentración de al menos 10⁷ partículas/mL se ponen en contacto con 2 mL de orina para capturar los péptidos que pudiesen estar presentes en un eppendorf. Se realiza el procedimiento de unión y lavado de las partículas a las

5 paredes del tubo por los procedimientos ya habituales para los técnicos en la materia usando un imán adaptado al tubo (Life Technologies, Miltenji, Sepmag). Se usa un anticuerpo anti-GIP conjugado a peroxidasa que se debe unir solo a las partículas que hayan capturado un GIP con dos epítomos. Tras los lavados usando la unión y desunión a las paredes del tubo dependiente del imán, se revela con luminol y se usa

10 un luminómetro para cuantificar la señal. La señal por encima del control negativo de la muestra sin GIPs, indicaría la presencia de péptidos del gluten.

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la detección de gluten ingerido en fluidos humanos caracterizado por la utilización de métodos inmunológicos que usen anticuerpos específicos que reconocen epítomos de las proteínas del gluten con las secuencias
5 siguientes: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 y/o sus derivados desaminados.
- 2.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según la reivindicación 1 en el que los métodos inmunológicos usan al menos uno de los anticuerpos monoclonales
10 siguientes: G12, A1 y R5.
- 3.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 o 2 caracterizado por que el fluido humano es orina, saliva, sudor, y suero.
- 4.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a 3 en el que los métodos inmunológicos se realizan mediante tiras
15 inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, inmunopartículas magnéticas, ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, Western blot, biosensores electroquímicos, biosensores de resonancia de plasmones, biosensores termoeléctricos y nanomecánicos.
- 5.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a 4
20 en el que los métodos inmunológicos usan alguno de los anticuerpos A1, G12 y R5 conjugados a moléculas que permiten un ensayo cuantitativo por densitometría, fluorimetría, luminiscencia o reacción electroquímica.
- 6.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se usa como patrón estándar algunos de los péptidos con las
25 secuencias de la reivindicación 1.
- 7.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se usa como patrón prolaminas del gluten pepsino-tripsinadas.
- 8.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a
30 7 en el que el método inmunológico se realiza mediante tiras inmunocromatográficas con alguno de los anticuerpos de la reivindicación 5.

9.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a 8 en el que se usa un lector para cuantificar la señal de la tira inmunocromatográfica.

10.- Procedimiento para la detección del gluten ingerido según las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque se realiza un paso previo de concentración de los péptidos a
5 detectar usando extracción en fase sólida.

11.- Uso de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la detección del incumplimiento de una dieta sin gluten.

12.- Uso de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para detectar la ingesta de gluten en individuos sometidos a dieta sin gluten pero con
10 síntomas agudos y persistentes de la enfermedad celíaca.

13.- Uso de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para monitorizar la efectividad de las terapias destinadas a evitar los efectos de la ingesta y formación de péptidos inmunogénicos del gluten.

14.- Kit analítico para detectar péptidos inmunogénicos del gluten en orina que
15 comprendan:

- Un patrón estándar de las reivindicaciones 6 y 7,
- Un anticuerpo reactivo contra los péptidos de la reivindicación 1.

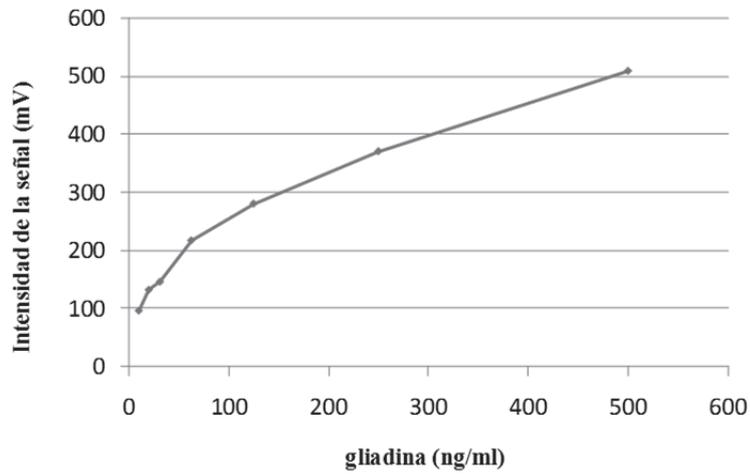
15.- Kit analítico para detectar péptidos inmunogénicos del gluten en orina que comprendan:

- 20
- Una columna de extracción de los péptidos en fase sólida,
 - Un patrón estándar de las reivindicaciones 6 y 7
 - Una solución de reacción,
 - un anticuerpo de la reivindicación 1 o 2.

16.- Kit analítico de las reivindicaciones 14 y 15 en el que el que el anticuerpo forma
25 parte de una tira inmunocromatográfica.

17.- Kit analítico de las reivindicaciones 14 y 15 en el que el que el anticuerpo está unido a una enzima.

Parámetros de calibración							
Gliadina (ng/ml)	10	20	31.2	62.5	125	250	500
Intensidad media (mV)	97.2	133	146.8	217.6	280.7	370.5	508.2
s	17,6	32,2	25,2	24,2	31,9	42,4	53,8
RSD (%)	18,10	24,21	17,15	11,12	11,35	11,44	10,59



Rodbard: $907,6 + (59,4 - 907,6) / (1 + X/468,8)^{0,8}$

Fig. 1

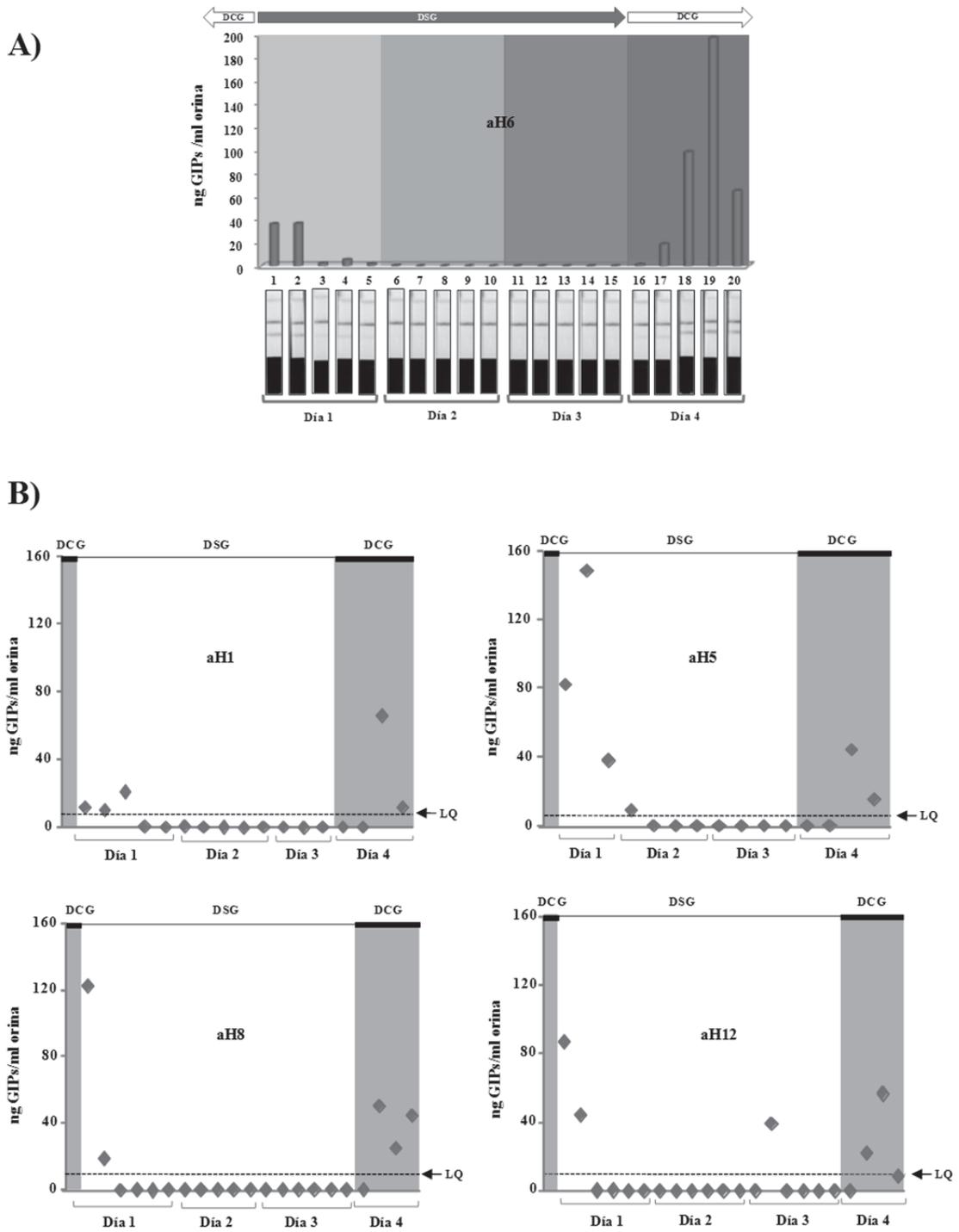


Fig. 2

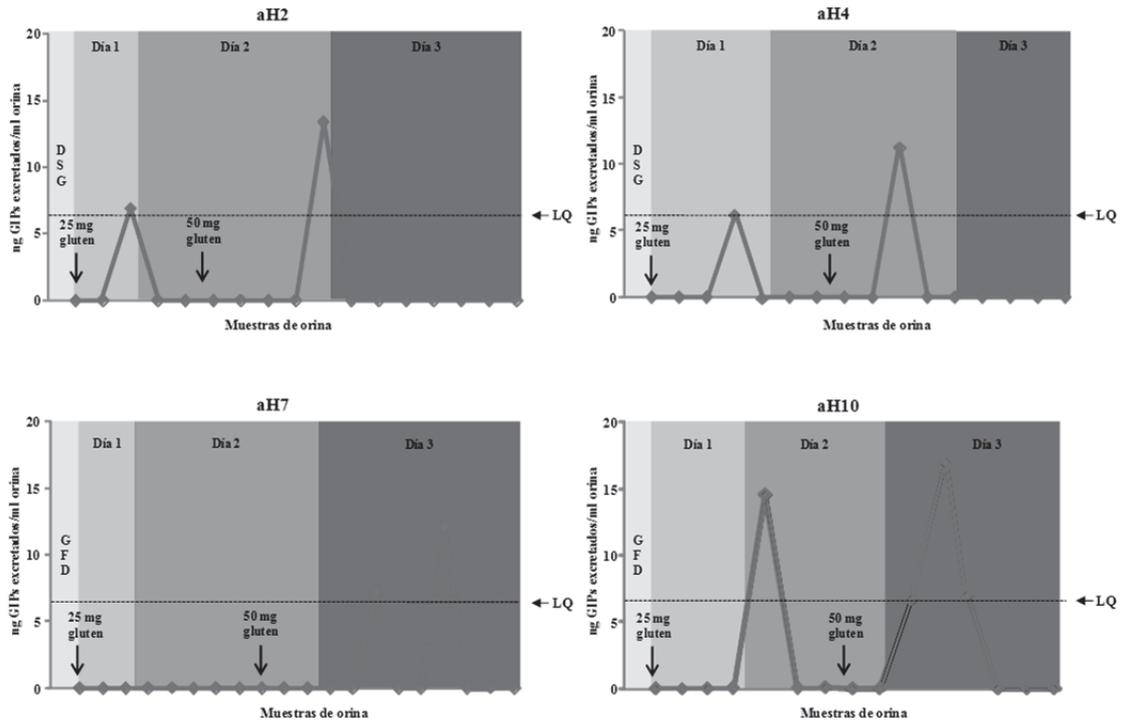


Fig. 3

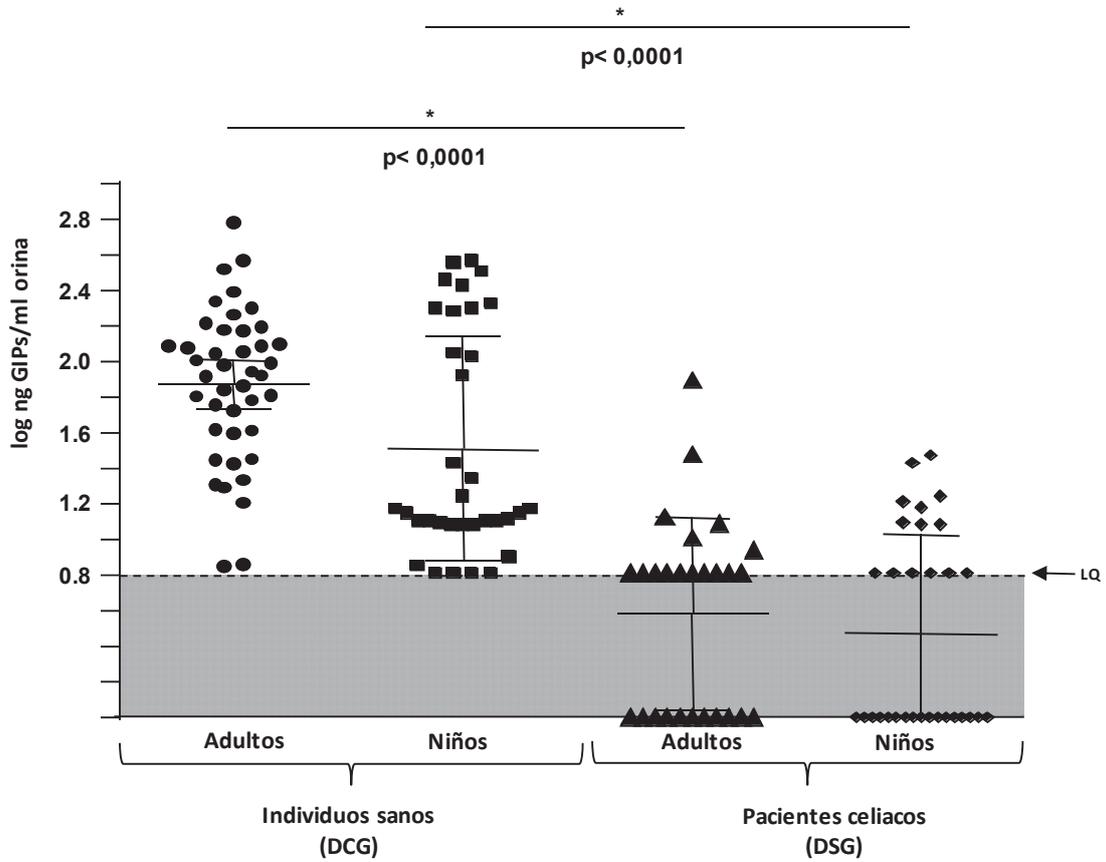


Fig. 4

Lista de Secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE SEVILLA
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
BIOMEDAL S.L.

<120> Detección de péptidos del gluten en fluidos humanos

<130> ES3007.5

<140> ES P201400569

<141> 2014-09-07

<160> 11

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 1

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
20 25 30

Phe

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 2

Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 3

Gln Pro Gln Leu Pro Phe
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 4

Gln Pro Gln Leu Pro Leu
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Hordeum sp.; Secale sp.

<400> 5

Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 6

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Hordeum sp.

<400> 7

Gln Leu Pro Phe Pro Gln Pro
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 8

Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 9

Gln Pro Gln Pro Leu Tyr
1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 10

Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro
1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Triticum sp.

<400> 11

Phe Pro Leu Glu Pro Glu Glu Pro

1

5



- ②¹ N.º solicitud: 201400569
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 09.07.2014
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/53** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2385455 A1 (UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 25.07.2012, todo el documento.	1-17
X	WO 2004045392 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY [US/US]) 03.06.2004, página 4, párrafo 17 – página 5, párrafo 20; página 14, párrafo 51; reivindicaciones 10-13,19,20.	1,2,4
A	SHAN L. et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. Science. 2002. Vol. 297, páginas 2275-2279, todo el documento.	1-17
A	MORÓN B. et al. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. PLoS One. 2008. Vol. 3(5) e:2294, página 1, resumen.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.11.2015

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

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

G01N

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-17	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2385455 A1	25.07.2012
D02	WO 2004045392 A2	03.06.2004
D03	SHAN L. et al. Science. 2002. Vol.297, páginas 2275-2279.	2002
D04	MORÓN B. et al. PLoS One. 2008. Vol. 3(5) e:2294.	2008

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

La presente invención divulga un método para la detección y cuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten en fluidos humanos, preferentemente orina, mediante ensayos inmunológicos con anticuerpos específicos (reivindicaciones 1-10). Se refiere también al uso de dicho procedimiento para detectar ingesta de gluten y para monitorizar la efectividad de terapias destinadas a evitar los efectos nocivos de los péptidos inmunogénicos del gluten (reivindicaciones 11-13), y a un kit para detección de estos péptidos (reivindicaciones 14-17).

El documento D01 divulga un método para la detección y cuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten en muestras de heces, mediante ensayos inmunológicos con anticuerpos específicos; así como al uso de dicho procedimiento para detectar ingesta de gluten y para monitorizar la efectividad de terapias destinadas a evitar los efectos nocivos de los péptidos inmunogénicos del gluten y un kit para detección de estos péptidos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un método para diagnóstico de la enfermedad celiaca mediante la detección de péptidos tóxicos del gluten en muestras de fluidos humanos, empleando anticuerpos específicos (ver página 4, párrafo 17 - página 5, párrafo 20; página 14, párrafo 51; reivindicaciones 10-13, 19, 20).

El documento D03 divulga un péptido de 33 aminoácidos de la alfa-gliadina y su relación con el inicio de la respuesta inflamatoria del gluten en pacientes celiacos; sugiriendo también su uso en terapia para tratamiento de dicha enfermedad (ver todo el documento).

El documento D04 divulga el uso de los anticuerpos monoclonales A1 y G12 para detectar, en muestras de alimentos, la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten que son tóxicos para enfermos celiacos (ver página 1, resumen).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

EL objeto técnico de la presente invención es un método para la detección y cuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten en fluidos humanos, preferentemente orina, mediante ensayos inmunológicos con anticuerpos específicos; así como el uso de dicho procedimiento para detectar ingesta de gluten y monitorizar la efectividad de terapias destinadas a evitar los efectos nocivos de los péptidos inmunogénicos del gluten y un kit para detección de estos péptidos.

1.1. REIVINDICACIONES 1-17

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un método para la detección y cuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten mediante ensayos inmunológicos, empleando los anticuerpos G12, A1 y R5, así como el uso de dicho procedimiento para detectar ingesta de gluten y monitorizar la efectividad de terapias.

El documento D02 también anticipa un método para diagnóstico de la enfermedad celiaca, mediante la detección en muestras de fluidos humanos, empleando anticuerpos específicos, de péptidos tóxicos del gluten, entre los que se encuentra el 33-mer.

La diferencia entre los documentos citados y la presente invención radica en que en el método descrito en D01 se refiere a la detección de los péptidos en muestras de heces en lugar de fluidos. Por otra parte, en el método anticipado en D02 no se cita explícitamente el uso de los anticuerpos G12, A1 y R5, siendo además el uso de este método para diagnóstico de la enfermedad.

En consecuencia, según los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-17 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**2.1. REIVINDICACIONES 1-17**

Sin embargo, se considera que resultaría obvio para un experto en la materia llevar a cabo el método descrito en el documento D01 en muestras de fluidos corporales humanos, en lugar de muestras de heces. También se considera obvio para un experto en la materia el uso del método anticipado en el documento D02 para detectar ingesta de gluten y monitorizar la efectividad de terapias, debido a que el elemento técnico es la detección del péptido 33-mer con anticuerpos específicos.

En consecuencia, según los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-17 no cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03 y D04, aunque también anticipan péptidos de la gliadina relacionados con la enfermedad celiaca y los anticuerpos específicos citados, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación a la novedad y actividad inventiva del objeto técnico de la invención.