

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 715**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2013 PCT/EP2013/001140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13722278 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2839290**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico presintomático de enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten**

30 Prioridad:

17.04.2012 DE 102012007510
17.04.2012 DE 102012007508

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:

AENEAS GMBH & CO. KG (100.0%)
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, DE

72 Inventor/es:

MATTHIAS, TORSTEN;
PFEIFFER, SASCHA;
PRAGER, KAI;
MEESTERS, CHRISTIAN y
JEREMIAS, PATRICIA

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 729 715 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el diagnóstico presintomático de enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten

- 5 La enfermedad celíaca, también denominada enteropatía sensible al gluten o esprúe, es una inflamación crónica del intestino delgado, a menudo con destrucción extensa de las células epiteliales intestinales, que puede conducir a un síndrome de malabsorción y/o enfermedades concomitantes inmunológicas.
- 10 La inflamación se activa en este sentido, en el caso de una disposición genética correspondiente, debido a una hipersensibilidad frente al gluten, un término colectivo para las denominadas "proteínas pegajosas" presentes en muchas especies de cereales. En el trigo, la prolamina inmunógena (la fracción soluble en alcohol) se denomina gliadina. Prolaminas homólogas son también conocidas en el centeno (secalinas), cebada (hordeínas) y avena (aveninas). En seres humanos con una predisposición correspondiente, estos fragmentos peptídicos pueden conducir a una reacción compleja de la mucosa intestinal y del sistema inmunitario.
- 15 Por gluten se entienden asimismo es particular derivados del gluten, gliadina o extractos homólogos de gliadina, péptidos de gliadina generados de manera no sintética o generados de manera sintética y derivados químicos de los mismos bajo "péptido de gliadina".
- 20 Determinados péptidos de gliadina o fragmentos de péptido de prolamina homólogos se captan por células presentadoras de antígeno, se procesan y se cargan en moléculas de HLA o se unen directamente a moléculas de HLA, principalmente a HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Esta unión se refuerza porque el aminoácido glutamina frecuentemente presente en el péptido se desamida. Esta desamidación se cataliza principalmente por la enzima transglutaminasa tisular (tTg), en particular por la transglutaminasa tisular 2 (tTg2). Además, la enzima cataliza también la
- 25 transamidación, mediante la que se induce una reticulación de los péptidos circundantes y proteínas. Mediante la desamidación de péptidos de gliadina se garantiza una unión de alta afinidad entre el péptido de gliadina y, por ejemplo, HLA-DQ2.
- 30 Este complejo péptido-HLA a su vez se une a linfocitos T CD4+, que a su vez conduce a la activación de la cascada de citoquinas inflamatorias. De esta manera se provoca cada vez más la producción de distintos mensajeros de desencadenantes de inflamación, tales como interferón gamma, TNF-alfa, interleucina-6 e interleucina-2.
- 35 En el transcurso de la inflamación se forman distintos anticuerpos que están dirigidos, por ejemplo, frente a gliadina (anticuerpos anti-gliadina) o frente a transglutaminasa tisular (anticuerpos anti-tTg). Por último, el proceso inflamatorio termina en la apoptosis de los enterocitos (enterocitos del epitelio del intestino delgado), lo que conduce a una pérdida más o menos pronunciada de vellosidades del intestino delgado (atrofia de las vellosidades). De esta manera, la mucosa del intestino delgado ya no puede transferir suficientes nutrientes desde el intestino hasta el torrente sanguíneo, mediante lo cual, en el efecto final, se produce un síndrome de malabsorción.
- 40 La prevalencia (número de enfermos en el momento del examen / número de individuos "considerados") de enfermedad celíaca o esprúe nativo es de 1: 100, sin embargo, estudios recientes suponen una prevalencia de alrededor de 1:50. En general, la enfermedad celíaca o esprúe nativo aparece con una frecuencia del 1% al 3% dentro del grupo de población caucásica.
- 45 La enfermedad celíaca tiene dos picos de manifestación, uno en la lactancia con alrededor de 6 a 18 meses, de uno a tres meses después de que los cereales se incluyeran en la dieta y un segundo pico a la edad de aproximadamente 30 a 40 años.
- 50 Los síntomas más frecuentes de la enfermedad celíaca o el esprúe son diarrea crónica causada por trastornos digestivos, deficiencia de hierro con o sin anemia y osteopenia. En niños afectados se observa a menudo un trastorno del crecimiento. Por ejemplo, síntomas más raros son fatiga crónica, nerviosismo, osteoporosis, osteomalacia, trastornos de ansiedad, depresiones, calambres musculares e intolerancia a la lactosa secundaria. Además, pueden aparecer también distintas enfermedades concomitantes, tales como, por ejemplo, una deficiencia selectiva de IgA, dermatitis herpetiforme, diabetes tipo I, y neoplasias malignas gastrointestinales.
- 55 El diagnóstico de enfermedad celíaca o esprúe se lleva a cabo preferentemente o de manera habitual por medio de un diagnóstico serológico y/o por medio de histología de biopsias de intestino delgado. El diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca o esprúe se examina habitualmente en presencia de anticuerpos frente a un antígeno extraño, tal como, por ejemplo, gliadina (anticuerpos anti-gliadina) o péptido de gliadina desamidado (anticuerpos anti-DGP) y
- 60 frente a autoantígenos del endomisio (anticuerpos anti-EMA), pero en particular frente a la transglutaminasa tisular 2 (anticuerpos anti-tTg2) o un complejo de transglutaminasa tisular y gliadina (anticuerpos anti-tTg / péptido de gliadina).
- 65 Los autoanticuerpos frente a antígenos endomisiales son altamente específicos y pueden detectarse en más del 90% de los pacientes con una enfermedad celíaca o esprúe nativo. En este sentido se trata de una prueba de inmunofluorescencia indirecta en secciones de tejido del esófago de mono. Las concentraciones de anticuerpo anti-endomisio reflejan la manifestación histológica: cuanto más altos son los títulos de anticuerpos, más pronunciada es

también la atrofia de las vellosidades. Sin embargo, la detección de anticuerpos anti-endomisio por medio de técnica de inmunofluorescencia no puede llevarse a cabo sin un esfuerzo considerable, dado que esta prueba requiere habilidades técnicas especiales del usuario, lleva mucho tiempo y se requiere material biológico relativamente raro (tejido esofágico de mono).

5 La detección de anticuerpos frente a gliadina se ha considerado históricamente la primera posibilidad para detectar una enfermedad celíaca o esprúe nativo con ayuda de un procedimiento de prueba de anticuerpos. Sin embargo, los anticuerpos anti-gliadina no son lo suficientemente específicos para detectar el esprúe nativo en una medida satisfactoria. La sensibilidad de detección podía mejorarse si se detectan anticuerpos anti-péptido de gliadina desamidado (DGD). Otra mejora para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad fue la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular.

En el diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca se detectan habitualmente anticuerpos anti-endomisiales.

15 Un elemento central del diagnóstico de la enfermedad celíaca fue y sigue siendo, en parte hoy en día, un examen histológico de una biopsia de intestino delgado, pudiendo variar el espectro histopatológico a este respecto desde un aumento mínimo de los linfocitos intraepiteliales hasta la atrofia vellosa completa. A este respecto hay elementos histopatológicos característicos: multiplicación de linfocitos intraepiteliales así como proliferación de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia, a menudo mezclados con eosinófilos; longitud disminuida de las vellosidades, profundización de las criptas; vellosidades disminuidas: relación de criptas (normal > 4-5:1); número de mitosis elevado; enterocitos anómalos (cuboides en lugar de células cilíndricas, pérdida de la polaridad nuclear basal, pérdida del borde del cepillo).

La clasificación histológica se efectúa habitualmente según la clasificación propuesta por Marsh.

25

Tabla: Clasificación de los criterios de Marsh [A.Vécsei et al. 2011 página 6]

Tipo	Criptas	Vellosidades
0	normales	normales
1	normales	normales
2	hiperplásicas	normales
3a	hiperplásicas	ligeramente acortadas
3b	hiperplásicas	considerablemente acortadas
3c	hiperplásicas	faltan completamente

Debido al diagnóstico de síntomas, hallazgos histológicos y hallazgos serológicos, así como la información genética y clínica, la enfermedad celíaca o esprúe nativo puede subdividirse en distintos subgrupos clínicos. Estos van desde el denominado "esprúe silencioso" pasando por "esprúe latente" hasta el esprúe manifiesto o clásico.

30

Un diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca o esprúe nativo es de importancia decisiva para la evolución de la enfermedad. Debido a que con un diagnóstico certero y oportuno, la enfermedad puede mantenerse en remisión mediante el cumplimiento constante de una dieta libre de gluten y los riesgos de enfermedades concomitantes y/o secundarias, tales como el aumento del riesgo de malignidad, se puede prevenir.

35

Por eso es de gran interés mejorar adicionalmente las pruebas de detección de enfermedad celíaca o esprúe nativo. Para una prueba rápida, fácil de llevar a cabo y económica se tienen en cuenta principalmente procedimientos de diagnóstico serológico.

40

Por ejemplo, el documento EP 0 912 898 B1 enseña un procedimiento de detección inmunológico de anticuerpos, que están dirigidos frente a transglutaminasa tisular (tTg). En este procedimiento de diagnóstico, se detectan anticuerpos frente a transglutaminasa tisular (tTG) a partir de los fluidos corporales mediante una reacción inmunitaria con la transglutaminasa tisular, en el que la reacción inmunitaria no se lleva a cabo con una sección de tejido de un tejido animal o humano.

45

El documento SKOVBJERG H et al. "Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Ámsterdam, NL, vol. 1690, n.º 3, lunes, viernes, 05 de noviembre de 2004 (05/11/2004), páginas 220-230, XP004614704, ISSN: 0925-4439, DOI: 10.1016/J.BBADIS.2004.06.009, divulga que la transglutaminasa tisular humana así como la transglutaminasa de *Streptovercillium* pueden desamidar un epítipo sintético de un péptido de gliadina.

50

El documento SKOVBJERG H et al. "Gliadin is a good substrate of several transglutaminases: possible implication in the pathogenesis of coeliac disease", *Scandinavian journal of Gastroenterology, informa healthcare*, Reino Unido, vol. 37, n.º 7, lunes, 1 de julio de 2002 (01/07/2002), páginas 812-817, XP009171985, ISSN: 0036-5521, divulga un procedimiento para medir la actividad de distintas transglutaminasas. Como sustrato utilizado, en este sentido, se usa Solpro 300, un gluten escindido proteolíticamente, por medio del que se sometieron a prueba las actividades de

55

transglutaminasa de transglutaminasa de hígado de cobaya, transglutaminasa de *Streptovercillium* y la transglutaminasa de *Phytophthora cactorum*.

5 El documento DEKKING et al.: "Microbial transglutaminases generate T cell stimulatory epitopes involved in celiac disease", JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, GB, vol. 47, n.º 2, lunes, miércoles, 27 de febrero de 2008 (27/02/2008), páginas 339 - 346, XP022500544, ISSN: 0733-5210, describe ensayos para la desamidación del gluten por la transglutaminasa microbiana *Streptovercillium mobaraense*. En este sentido podía mostrarse que la transglutaminasa microbiana presenta un espectro de sustrato más amplio que la transglutaminasa tisular y puede desamidar péptidos de gluten tanto sintéticos como naturales.

10 El documento WO 2008/053310 A2 describe el uso de un procedimiento enzimático para el tratamiento de harina, sémola y extractos de proteínas de cereales, que son conocidos para provocar una respuesta inmunitaria patógena en pacientes con EC (enfermedad celíaca). El procedimiento emplea en este sentido la actividad catalítica de transglutaminasa microbiana para reducir o eliminar completamente de este modo la toxicidad del gluten o productos similares de este cereal.

15 El documento BIZZARO N et al. "Cutting-edge issues in celiac disease and in gluten intolerance", Clinical Reviews in Allergy & Immunology, Humana Press Inc., Nueva York, vol. 42, n.º 3, 23 de diciembre de 2010 (23/12/2010), páginas 279-287, XP035055779, ISSN: 1559-0267, DOI: 10.1007/S12016-010-8223-1, describe aspectos relevantes relacionados con el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad celíaca y la intolerancia al gluten en relación con las combinaciones de prueba más adecuadas para un diagnóstico temprano y preciso de la enfermedad. Entre otras cosas, el documento describe pruebas para la detección de anticuerpos frente a complejos de transglutaminasa tisular y gliadina.

25 Además, se conocen procedimientos de prueba que pueden detectar anticuerpos que están dirigidos frente a un complejo de transglutaminasa tisular (tTG) y péptidos de gliadina. Tales procedimientos de prueba son ofrecidos, por ejemplo, por la empresa AESKU.Diagnostics. Se ha demostrado que con estos procedimientos de prueba puede detectarse la formación de anticuerpos, que se produce antes de todas las otras pruebas del estado de la técnica.

30 Además, se describe también una intolerancia o sensibilidad al gluten, que no se provoca por la enfermedad celíaca. Esta enfermedad ha de diferenciarse de la enfermedad celíaca y no es ni una enfermedad autoinmunitaria, ni una alergia al trigo. Ambas cosas tienen que descartarse para su diagnóstico. Además, debe determinarse si con una dieta sin gluten tiene lugar una mejora. Hasta el momento, para esta enfermedad no se ha encontrado ningún biomarcador.

35 Es objetivo de la presente invención proporcionar una prueba de diagnóstico que puede, ya antes del desarrollo de síntomas, es decir de manera presintomática, detectar la enfermedad celíaca o esprúe así como una sensibilidad al gluten y, por lo tanto, permitir un diagnóstico temprano o un control de terapia de la enfermedad celíaca o esprúe o intolerancias al gluten generales o sensibilidad al gluten.

40 Este objetivo se consigue mediante las características definidas en las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, se ha encontrado que, para el diagnóstico y/o control de terapia de la enfermedad celíaca o esprúe o sensibilidad al gluten, en lugar de la transglutaminasa tisular (tTG), se usa al menos complejo inmunológicamente reactivo, funcional, de transglutaminasa microbiana (mTG) o partes de la misma y gliadina o péptidos parciales de la misma. A continuación, por el término gliadina no solo se entiende gliadina en sí, sino también péptidos de gliadina así como péptidos parciales de los mismos.

45 Sorprendentemente, se ha encontrado en concreto que en un estadio temprano de las enfermedades mencionadas anteriormente pueden encontrarse anticuerpos que se unen a un complejo que está formado por transglutaminasa microbiana y gliadina, en el que el complejo inmunológicamente reactivo sirve para la detección de anticuerpos a partir de una muestra y estos anticuerpos son detectables, incluso antes de que sean detectables anticuerpos, que se forman frente a un complejo de transglutaminasa tisular y gliadina. Esto es aún más sorprendente dado que la transglutaminasa microbiana tiene una secuencia completamente diferente a la de la transglutaminasa tisular (tTG) humana.

50 De manera análoga a la función de la transglutaminasa tisular, también en la generación del complejo usado de acuerdo con la invención que se parte de que la relación de desamidación con respecto a transamidación asciende a 4:1 y que el complejo usado de acuerdo con la invención no presenta forzosamente una especie molecular covalentemente complejada con la transglutaminasa. El complejo se forma preferentemente mediante una incubación de péptidos de gliadina y transglutaminasa microbiana. El componente individual mTg no muestra actividad inmunológica alguna en muestras humanas, los péptidos de gliadina son antígenos conocidos según el estado de la técnica y, por lo tanto, muestran actividad inmunológica en muestras de pacientes humanos. Sin embargo, después de la complejación entre los péptidos de gliadina y mTg, la actividad inmunológica es claramente mayor que la de los componentes individuales juntos.

65 De manera análoga al complejo de tTG2 y péptidos de gliadina, también en caso del complejo usado de acuerdo con la invención se parte de que la distribución de los péptidos de gliadina reticulados y la enzima tiene lugar de manera

estocástica, que está probada por las mediciones de dispersión de la luz. Estos complejos incluyen la transglutaminasa microbiana y muestran actividad inmunológica, que es adecuada en pruebas de competición para interceptar los epítomos de tTg2 con péptidos de gliadina.

5 Esto se prueba mediante pruebas de competición, que se llevaron a cabo con distintos sueros de pacientes (véase la Figura 5).

La presente invención se refiere también a anticuerpos que se unen al complejo usado de acuerdo con la invención de transglutaminasa microbiana y péptidos de gliadina o a partes inmunológicamente activas de este complejo. Los anticuerpos de acuerdo con la invención comprenden anticuerpos policlonales y/o monoclonales y/o aptámeros. Por un anticuerpo se entiende a este respecto una proteína que presenta uno o varios sitios de unión a antígeno específicos. El experto en la materia es capaz, sin carga excesiva, de generar un anticuerpo que se une de manera específica al complejo usado de acuerdo con la invención de transglutaminasa microbiana y péptidos de gliadina o a partes inmunológicamente activas de este complejo. Los expertos en la materia conocen las técnicas y las formas de proceder correspondientes de la práctica de laboratorio diaria. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden generarse también, por ejemplo, porque se aíslan los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con enfermedad celíaca o esprúe o de pacientes sensibles al gluten por medio de un complejo usado de acuerdo con la invención, purificarse y con ello hacerse accesible. Sin estar limitado a ello, se supone que los anticuerpos se unen a un neopéptido en las proximidades del centro activo de la enzima mTgasa. Para ello, por ejemplo el complejo usado de acuerdo con la invención, puede encontrarse acoplado a un portador, el portador cargado se pone en contacto entonces con suero de paciente con enfermedad celíaca o esprúe. Los constituyentes del suero unidos de manera no específica se eliminan y los anticuerpos unidos específicamente al complejo usado de acuerdo con la invención se eluyen del mismo.

25 La presente invención se refiere también a un uso del complejo de transglutaminasa microbiana y gliadina o sus péptidos parciales para la detección *in vitro* de anticuerpos que se unen a este complejo. El uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que:

1. se pone en contacto un complejo usado de acuerdo con la invención con una muestra *in vitro*; y
2. por que se detectan anticuerpos unidos al complejo usado de acuerdo con la invención.

Para los fines de la presente invención, por el término "*in vitro*" se entiende cualquier entorno que no se encuentre dentro de un organismo completo, por ejemplo, de un cuerpo humano o animal.

35 Por una muestra se entiende una composición va a examinarse. Preferentemente, en el caso de la muestra se trata de material biológico o médico, es decir, material que se obtiene de un organismo, de constituyentes de un organismo o de células. El material puede, antes de emplearse como muestra en el procedimiento de acuerdo con la invención, someterse a etapas de tratamiento adicionales, por ejemplo para pasar el material a un estado en el que es especialmente adecuado como muestra para el procedimiento. De manera especialmente preferente, en el caso de la muestra se trata de material que se obtuvo de un fluido corporal o se compone de un fluido corporal. Fluidos corporales preferidos son sangre, plasma, suero, linfa, líquido sinovial, orina, heces, líquido intersticial, saliva, sudor, líquido cefalorraquídeo, leche materna y/o líquido lagrimal. Se prefieren especialmente aquellos fluidos corporales en los que pueden encontrarse anticuerpos en alta concentración.

45 En uso de acuerdo con la invención se pone en contacto un complejo usado de acuerdo con la invención con una muestra que va a examinarse *in vitro*. La etapa de la puesta en contacto sirve para que anticuerpos dado el caso contenidos en la muestra tengan la posibilidad de unirse a un epítomo del complejo usado de acuerdo con la invención. Para ello, esta etapa se lleva a cabo en condiciones y en un entorno que permiten una unión específica antígeno-anticuerpo. El experto en la materia conoce condiciones adecuadas. Preferentemente, estas condiciones comprenden un entorno líquido (opcionalmente también materiales de soporte sólidos) y/o la puesta en contacto a una temperatura de $> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $< 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. La puesta en contacto se lleva a cabo preferentemente durante un período de tiempo que permite una formación de una unión específica antígeno-anticuerpo entre el complejo usado de acuerdo con la invención y, anticuerpo opcionalmente contenido en la muestra, específico para el complejo de transglutaminasa microbiana y gliadina o sus péptidos parciales inmunológicamente activos.

55 En una etapa posterior del uso de acuerdo con la invención, se detecta un anticuerpo que está unido específicamente al complejo de transglutaminasa microbiana y péptidos de gliadina. La detección del anticuerpo unido específicamente al complejo usado de acuerdo con la invención puede tener lugar, por ejemplo, por que después de la puesta en contacto, se retiran tales componentes de la muestra, por ejemplo mediante una o varias etapas de lavado, purificación o aislamiento, que no están unidos al complejo de transglutaminasa microbiana y gliadina o sus péptidos parciales de este complejo. Después puede llevarse a cabo una detección específica de anticuerpos por medio de métodos habituales, conocidos por el experto en la materia. A este respecto, la detección puede tener lugar en una o en varias etapas. En el caso de estos agentes para la detección específica de anticuerpos pueden tratarse por ejemplo, en sí, de anticuerpos. La detección puede tener lugar entonces, por ejemplo mediante una reacción colorimétrica, que se media o desencadena directa o indirectamente por los agentes para la detección de anticuerpos. Por ejemplo, anticuerpos para la detección de anticuerpos específicos pueden estar unidos a grupos funcionales o moléculas (por

ejemplo, enzimas) que son capaces de desencadenar o mediar una reacción colorimétrica en determinadas condiciones.

5 En un uso de acuerdo con la invención, el complejo de transglutaminasa microbiana y gliadina o sus péptidos parciales durante una, varias o todas las etapas del uso, puede encontrarse inmovilizado en un portador. Por inmovilización se entiende en este sentido cualquier acoplamiento, unión o asociación de otro tipo entre complejo y portador, que lleva a que complejo y portador no puedan moverse por separado uno de otro. Como portador pueden emplearse, por ejemplo, moléculas y/o superficies que están diseñadas de tal manera que pueden unirse de manera reversible o irreversible con el complejo. Para ello, los portadores y/o gliadinas usadas de acuerdo con la invención y/o complejos
10 usados de acuerdo con la invención pueden presentar grupos funcionales que favorecen y/o permiten una unión entre gliadinas y/o complejos y portadores usados de acuerdo con la invención. A modo de ejemplo, como portadores se mencionan moléculas, tales como BSA o superficies, tal como se ofrecen por micropartículas, nanopartículas o perlas magnéticas o superficies de membranas seleccionadas, polímeros (por ejemplo, poliestireno) o placas de microtitulación o tiras de prueba que comprenden tales superficies. El experto en la materia conoce portadores
15 adecuados y posibilidades para la unión de complejos de proteína y portadores.

En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo como procedimiento de inmunoensayo, procedimientos de inmunoensayo adecuados se describen en "Labor und Diagnose", página 756 y
20 siguientes (ISBN 3980521567).

Preferentemente, el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo como procedimiento de ELISA (ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), técnicas de ELISA adecuadas se describen en "Labor und Diagnose", página 1470 y siguientes (ISBN 3980521567). Para ello puede ponerse en contacto una muestra con un complejo usado de acuerdo con la invención inmovilizado sobre un portador, dado el caso se retiran los constituyentes
25 no unidos en parte o esencialmente, a continuación, para la detección de anticuerpo de muestra unido al complejo usado de acuerdo con la invención, se usa un anticuerpo acoplado o que puede acoplarse a un grupo funcional. La detección tiene lugar por regla general a través de una reacción detectable ópticamente.

El anticuerpo para la detección puede ser por ejemplo específico para anticuerpos de un organismo determinado o de un origen determinado y/o para una forma determinada del anticuerpo, preferentemente para un isotipo determinado, por ejemplo anticuerpos del tipo IgA, IgM, IgE y/o IgG, más preferentemente para la IgA humana, IgM, IgE y/o IgG humana.
30

En cambio, el uso de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo también en otros formatos, así por ejemplo como RIA (radioinmunoensayo), como inmunoensayo (por ejemplo, transferencias lineales o ELISA) o en procedimientos basados en líquidos tales como HTRF (fluorescencia de resolución temporal homogénea). El uso de acuerdo con la invención puede emplearse también en combinación en los denominados ensayos multiplex (ensayos con otros biomarcadores) en los procedimientos técnicos mencionados.
35

El presente uso es adecuado para la detección de anticuerpos frente a un complejo usado de acuerdo con la invención, en particular para la detección de anticuerpos del tipo IgA, IgG, se prefieren IgM y/o IgE preferentemente para la detección de anticuerpos de origen humano.
40

El uso de acuerdo con la invención puede usarse para el diagnóstico, en particular para el diagnóstico serológico, preferentemente para el diagnóstico de enfermedad celíaca y/o esprúe nativo y/o esprúe tropical y/o detección temprana de intolerancias generales al gluten y/o dermatitis herpetiforme.
45

La presente invención comprende también un kit para la determinación o el diagnóstico y/o control de terapia de enfermedad celíaca o esprúe así de sensibilidad al gluten, comprendiendo el kit una transglutaminasa microbiana o partes de la misma, que se encuentra en un complejo con gliadina o péptidos parciales de la misma, así como medios adicionales para la detección específica de anticuerpos unidos al complejo inmunológicamente reactivo a partir de una muestra. Adicionalmente, el kit puede contener instrucciones para el uso del kit y/o para llevar a cabo el uso de acuerdo con la invención que puede llevarse a cabo con el kit.
50

Preferentemente, el kit está realizado como ELISA o en particular como una prueba de tira. Es decir, el kit usado de acuerdo con la invención comprende el complejo usado de acuerdo con la invención y, opcionalmente, otros constituyentes para llevar a cabo el uso de acuerdo con la invención en un molde que es adecuado para la realización en el formato ELISA y/o prueba de tira. En particular, el kit puede comprender el complejo usado de acuerdo con la invención acoplado a una tira reactiva.
55

El kit usado de acuerdo con la invención puede contener dado el caso otros constituyentes para llevar a cabo el uso de acuerdo con la invención. Tales constituyentes pueden comprender por ejemplo recipientes de reacción, filtros, enzimas modificadoras de proteínas y/u otros agentes. En particular, el kit de acuerdo con la invención puede contener medios para la detección de anticuerpos, preferentemente de anticuerpos humanos de tipo IgA, IgM, IgE y/o IgG. En particular, el kit usado de acuerdo con la invención es adecuado para su uso en el diagnóstico, preferentemente en el diagnóstico serológico, de manera muy especialmente preferida en el diagnóstico de enfermedad celíaca, esprúe,
60
65

dermatitis herpetiforme y/o sensibilidad al gluten.

El kit usado de acuerdo con la invención puede contener dado el caso agentes adicionales para llevar a cabo el uso de acuerdo con la invención y/o para la clasificación de la enfermedad celíaca o del esprúe en subgrupos específicos (véase anteriormente, por ejemplo, enfermedad celíaca silenciosa, latente o establecida). Los agentes de este tipo pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos anti-tTg, anticuerpos anti-complejo de tTG/péptido de gliadina, anticuerpos anti-DGP, anticuerpos anti-gliadina, etc.

La **Figura 1** muestra una alineación por parejas de las secuencias de aminoácidos de la transglutamasa microbiana (mTG) de *Streptomyces mobaraensis* y de transglutamasa tisular humana 2 (TG2) con el uso del algoritmo "strecher". La comparación de secuencias se llevó a cabo por medio de la "herramienta de alineación por parejas" EMBOSS (de EMBL-EBI), a la que se puede acceder libremente en Internet.

La **Figura 2** muestra una alineación por parejas de las secuencias de aminoácidos de la transglutamasa microbiana (mTG) de *Streptomyces mobaraensis* y de transglutamasa tisular humana 2 (TG2) con el uso del algoritmo "needle". La comparación de secuencias se llevó a cabo por medio de la "herramienta de alineación por parejas" EMBOSS (de EMBL-EBI), a la que se puede acceder libremente en Internet.

La **Figura 3** muestra en forma de diagrama los resultados de una prueba de competición de suero 1011 (IgA), en donde está representada la absorción en función de la concentración de los competidores. Los competidores individuales se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 4** muestra en forma de diagrama los resultados de una prueba de competición de suero 1038 (IgA), en donde está representada la absorción en función de la concentración de los competidores. Los competidores individuales se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 5** muestra en forma de diagrama los resultados de una prueba de competición de suero 1011 (IgG), en donde está representada la absorción en función de la concentración de los competidores. Los competidores individuales se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 6** muestra en forma de diagrama los resultados de una prueba de competición de suero 1038 (IgG), en donde está representada la absorción en función de la concentración de los competidores. Los competidores individuales se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 7** muestra en forma de un diagrama los resultados de una medición a través de AF4-MALS para la formación de complejos de gliadina y transglutaminasa microbiana, estando representada la denominada relación "rayleigh" en función del tiempo. Los componentes individuales de la medición se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 8** muestra en forma de un diagrama los resultados de una medición a través de AF4-MALS para la formación de complejos de gliadina y transglutaminasa microbiana, en donde está representada la masa molar en g/mol en función del tiempo. Los componentes individuales de la medición se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 9** muestra en forma de un diagrama los resultados de una medición a través de SEC- MALS para la formación de complejos de gliadina y transglutaminasa microbiana, estando representada la denominada relación "rayleigh" en función del tiempo. Los componentes individuales de la medición se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 10** muestra en forma de un diagrama los resultados de una medición a través de SEC- MALS para la formación de complejos de gliadina y transglutaminasa microbiana, en donde está representada la masa molar en g/mol en función del tiempo. Los componentes individuales de la medición se pueden extraer de la leyenda del diagrama.

La **Figura 11** muestra una clasificación esquemática de distintos estadios de detección de la enfermedad celíaca o esprúe. El fundamento es en este sentido la (primera) aparición en diferentes momentos de distintos anticuerpos de diagnóstico.

La **Figura 12** muestra: $-\log(\text{valores } P)$ de la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para comprobar la verificar la secuencia esperada de aparición de anticuerpos.

Ejemplos

Alineación de secuencias de aminoácidos

Se mostrará que la transglutaminasa microbiana (mTG) de *Streptomyces mobaraensis* y la transglutaminasa tisular

humana (TG2) tienen poca similitud a nivel de secuencia.

Para este fin se compararon las secuencias Q5UCB5 (mTG) y P21980 (TG2) presentes en la base de datos, Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Se llevó a cabo una comparación de secuencias por medio de la "herramienta de alineación por pares" presente en internet EMBOSS (de EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>). Se usaron los algoritmos "needle" o "stretcher".

Tal como puede verse en la Figura 1 o la Figura 2, no existe prácticamente homología entre las secuencias usadas, independientemente de qué algoritmo se use. La alineación por parejas entre transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis* y transglutaminasa tisular humana, tiene solo una similitud del 23,6% y una identidad del 14,3% en el caso del uso del algoritmo "stretcher", y en el caso del uso del algoritmo "needle" únicamente una similitud del 15,3% y una identidad del 9,2%.

Pruebas de competición

En ensayos de competición se somete a prueba si existe una relación entre el complejo formado de la transglutaminasa tisular humana con gliadina y el complejo usado de acuerdo con la invención. Para ello se mezclan sueros de pacientes que contienen anticuerpos contra el complejo de transglutaminasa tisular y gliadina los componentes individuales, así como el complejo de transglutaminasa microbiana y gliadina de acuerdo con la invención formado y aplicó sobre una placa de microtitulación recubierta con el complejo de transglutaminasa tisular y gliadina. A través de la intensidad de una reacción colorimétrica puede determinarse ahora con qué intensidad contribuye cada componente al resultado de la prueba, es decir, qué proporción reactiva de los anticuerpos se une a los componentes respectivos. Si los anticuerpos no solo se unen al complejo de transglutaminasa tisular humana y gliadina, sino que también se unen a los otros competidores, estos anticuerpos quedan atrapados (y por lo tanto ya no pueden unirse a la placa de microtitulación) y la reacción colorimétrica queda por debajo en comparación con el valor de referencia. Para obtener un valor de referencia, se aplica el suero de paciente directamente sobre la placa recubierta con el complejo de transglutaminasa tisular humana y gliadina.

Para llevar a cabo la prueba de competición, se utilizó un kit de nueva generación de tTg AESKUKLISA de la empresa AESKU.Diagnostics, que es adecuado para una determinación cuantitativa y cualitativa separada de anticuerpos anti-IgA y/o anti-IgG, dirigidos frente a un complejo de transglutaminasa tisular y gliadina, en sueros humanos.

Concentraciones de los componentes individuales:

Los componentes mTG, DGP, tTG así como gliadina se emplearon en las concentraciones 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 y 1,0 µg/ml (se llevó a cabo una determinación doble de la concentración respectiva).

El suero se incubó en cada caso con el competidor respectivo y a continuación se midió en el ELISA convencional según las indicaciones del fabricante.

Sueros usados:

Se usaron los sueros de celíacos con los números de suero 1011, 1020, 1038 así como 1045.

Los sueros 1011 así como 1038 se diluyeron previamente 1:10 con un suero de donante de sangre y finalmente de nuevo 1:100 con tampón de muestra.

El grado de competición se calculó en cada suero en comparación con el valor de referencia. El valor de referencia se estableció en 100% y se crearon diagramas con ayuda de Microsoft Office Excel.

Resultados de la prueba de competición IgA o IgG:

Puede apreciarse que los anticuerpos se captaron por los componentes individuales, véanse sueros 1011 así como 1038 (Figura 3 y Figura 4 para IgA y Figura 5 y Figura 6 para IgG). En los cuatro casos, la adición de los componentes DGP, gliadina y mTg apenas tiene influencia sobre la intensidad de color de la reacción, de modo que puede partirse de que los anticuerpos en los sueros de pacientes están dirigidos exclusivamente frente al complejo usado de acuerdo con la invención.

Mediciones de la formación de complejos a través de AF4/SEC MALS

Los complejos respectivos se separaron a través de una columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC) o por fraccionamiento de flujo de campo de flujo asimétrico AF4 y se analizaron mediante dispersión de luz de múltiples ángulos (Multi Angle Light Scattering - MALS).

A través de la medición por medio de MALS es posible una comparación de la distribución de masa contenida en una muestra. Con ayuda de la comparación de masas de MALS, se detectará la conversión de los componentes individuales gliadina con la respectiva transglutaminasa (mTg o tTg) en un complejo.

La adición de mTg conduce a masas claramente más altas en comparación con gliadina sin *análisis de ELISA* de mTg de los sueros de *pacientes celíacos*

5 Los sueros de enfermedad celíaca usados (N = 82) así como 33 sueros control (donantes de sangre) se sometieron a prueba en los siguientes kits de AESKU, así como en placas recubiertas en sí.

Los sueros se sometieron a prueba para detectar anticuerpos anti-IgA así como anti-IgG frente a los componentes o complejos individuales.

10 Kits AESKU:

- AESKULISA GliA

15

- AESKULISA DGP

- AESKULISA tTg

- AESKULISA tTg New Generation

20 Placas recubiertas en sí:

- Transglutaminasa Microbiana

- Gliadina en agua

- Gliadina con transglutaminasa microbiana

25 Complejo mTg-gliadina purificado

Los resultados de ELISA están resumidos en la tabla 1. La concentración de las soluciones de proteína se determinó por medio de la DO a 280 nm (suposición: 1 DO = 1 µg/ml).

30

Tabla 1: Extractos del análisis de ROC.

Marcador	AUC	Sensibilidad	Especificidad
AESKULISA tTg-G New Generation	0,95 +/- 0,02	0,87 +/- 0,04	0,93 +/- 0,03
AESKULISA GliA G	0,671 +/- 0,042	0,65 +/- 0,06	0,89 +/- 0,04
complejo mTg-GP-IgG	0,89 +/- 0,03	0,91 +/- 0,03	1,00 +/- 0,00
ELISA de tTg-IgG	0,81 +/- 0,04	0,6 +/- 0,06	0,94 +/- 0,03
ELISA de mTg-IgG	no determinable		
AESKULISA DGP IgG	0,73 +/- 0,04	0,58 +/- 0,06	0,79 +/- 0,05
AESKULISA tTg-A New Generation	0,95 +/- 0,02	0,89 +/- 0,04	0,93 +/- 0,03
AESKULISA GliA A	0,77 +/- 0,04	0,67 +/- 0,06	0,81 +/- 0,04
complejo de mTg-IgA	0,90 +/- 0,03	0,69 +/- 0,054	1,00 +/- 0,00
ELISA de tTg-IgA	0,87 +/- 0,03	0,62 +/- 0,06	1,00 +/- 0,00
ELISA de mTg-IgA	no determinable		
AESKULISA DGP IgA	0,68 +/- 0,04	0,41 +/- 0,06	0,96 +/- 0,02

Dado que para ELISA de mTg no es posible ninguna transformación en otras unidades (pruebas no establecidas), estos análisis se basan en las densidades ópticas de los ensayos, optimizándose la relación sensibilidad / especificidad de modo que su suma sea máxima (el denominado índice de Youden).

35

Debido al sesgo de selección, estos valores se desvían de los de un ensayo clínico.

Como prueba la Tabla 1, los ELISA de complejo de mTg se comportan de manera diferente a los otros parámetros y también de manera diferente a los ELISA de complejo de tTg-gliadina. Cabe señalar que no es posible una diferenciación a través de los anticuerpos frente a la mTg pura. Ha de indicarse que los ELISA de complejo de tTg2-gliadina, si bien tiene significativamente un mejor éxito que los ELISA de complejo de mTg-gliadina, en cambio, estos, a su vez, son mejores que los otros ELISA, aunque los pacientes apenas reaccionan directamente a la mTg. Como ya se ha explicado, ha de partirse por lo de una similitud de epítipo entre los complejos de tTg2-gliadina y los complejos de mTg-gliadina, pero no necesariamente una igualdad de epítipo.

40

45

Si el complejo usado de acuerdo con la invención representa el primer epítipo inmunopotente para una nueva enfermedad celíaca, entonces, el mimetismo del epítipo molecular puede llevar a que el sistema inmunitario del paciente, como consecuencia, recluye anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular endógena en el complejo con gliadina y posteriormente, como consecuencia de un mimetismo de epítipo molecular secundaria, frente a epítipos que se reclutan también de la transglutaminasa tisular, gliadina, péptidos de gliadina o derivados desamidados (DGP

= péptidos de gliadina desamidados). Los pacientes celíacos no siempre parecen aumentar su título de anticuerpos frente a determinados epítomos, sino que parece que se forman transiciones transitorias de uno de los epítomos descritos, lo que designa más bien manteniendo los "títulos residuales", el curso de la enfermedad, en particular también dado que una dieta sin gluten puede llevar a un título más bajo de los anticuerpos establecidos.

5 Para probar este hecho, se llevó a cabo una prueba múltiple de Wilcoxon-Mann-Whitney (también prueba U) en un panel de sueros existente (75 muestras de suero de pacientes celíacos independientes de distintas nacionalidades) como prueba de suma de rangos y los valores de P obtenidos se mostraron como una medida de las diferencias en la distribución de rangos. En este sentido, se aplica el logaritmo del valor de P de manera análoga a la denominada gráfica de Manhattan y se invierte el signo (cuanto más pronunciada es la diferencia de suma de rangos de los pares de parámetros, mayor es la barra), correspondiente las barras horizontales al umbral de significación de Bonferroni, como corrección más conservadora posible para pruebas múltiples. De acuerdo con los hechos descritos anteriormente, se puede partir de que pares de epítomos análogos (por ejemplo, anticuerpos anti-gliadina frente a anticuerpos anti-DGP o anticuerpos anti-complejo de mTgasa-péptido de gliadina frente a anticuerpos anti-complejo de anti-transglutaminasa tisular humana) presentan sumas de rangos más uniformes (barras de valor P más pequeñas) que los epítomos, sus niveles de título se correlacionan con la progresión de la enfermedad (por ejemplo, anticuerpos anti-complejo de mTgasa-péptido de gliadina frente a anticuerpos anti-gliadina).

20 Mediante la detección de estos anticuerpos, también pudieron identificarse pacientes celíacos o con esprúe que no se detectan con una o varias pruebas de diagnóstico serológicas distintas para la enfermedad celíaca o esprúe. De esta manera, con el uso de acuerdo con la invención pueden identificarse también aquellos pacientes que se clasificaron previamente como falsos negativos. En nuestro panel de 75 sueros positivos para enfermedad celíaca, esto se refiere en total a 8 sueros en la prueba de anticuerpos anti-complejo de tTg-gliadina, 25 sueros en la prueba de anticuerpos anti-gliadina, 44 sueros en la prueba de anticuerpos anti-DGP y 28 sueros en la prueba de anticuerpos anti-tTg o anticuerpos anti-IgA. La brecha de diagnóstico que se concluirá con ello es, por lo tanto, altamente significativa (valor de P de $7,4 \cdot 10^{-8}$ en una prueba de tendencia de Cochran-Armitage sobre la tendencia del complejo usado de acuerdo con la invención). Con la introducción del kit mencionado en la solicitud, puede aumentarse la brecha cerrada, por que el panel de sueros considerado está sujeto a un sesgo de selección, que tiende de todos modos a pacientes diagnosticados positivamente.

30 El hallazgo del complejo usado de acuerdo con la invención es tanto más sorprendente, dado que casi no hay homología alguna entre la transglutaminasa microbiana y la transglutaminasa tisular.

Listado de secuencias

35 <110> AESKU.Diagnostics GmbH & Co.KG Procedimiento para el diagnóstico presintomático
 <120> de enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten
 <160>2
 <210> 1
 40 <211> 410
 <212> Proteína
 <213> Streptomyces mobaraensis
 <400> 1

ES 2 729 715 T3

Met Ser Gln Arg Gly Arg Thr Leu Val Phe Ala
 Ala Leu Gly Ala Val Met Cys Thr Thr Ala Leu
 Met Pro Ser Ala Gly Ala Ala Thr Gly Ser Gly
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Glu Glu Lys Arg Ser
 Tyr Ala Glu Thr His Arg Leu Thr Ala Asp Asp
 Val Asp Asp Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
 Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg
 Ala Pro Asp Ser Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro
 Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr
 Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Ile Val
 Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr
 Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr
 Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys
 Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr
 Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Phe Phe Asp
 Glu Asp Lys Tyr Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly
 Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe
 Glu Gly Arg Val Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu
 Ala Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Asp Val Ala
 Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His
 Asp Glu Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys
 Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn
 Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu
 Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly
 Gly Asn His Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val
 Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp
 Arg Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly
 Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Arg Gly Thr
 Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile
 Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe
 Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln
 Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr
 His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser
 Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe
 Arg Asn Trp Ser Asp Gly Tyr Ser Asp Phe Asp
 Arg Gly Ala Tyr Val Val Thr Phe Val Pro Lys
 Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln
 Gly Trp Pro

<110> AESKU.Diagnostics GmbH & Co.KG

<120> Procedimiento para el diagnóstico presintomático de enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten

5 <160> 2

<210> 2

<211> 286

<212> Proteína

<213> Triticum aestivum

10 <400> 2

ES 2 729 715 T3

Met Lys Thr Phe Leu Ile Leu Val Leu Leu Ala
Ile Val Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Val Arg
Phe Pro Val Pro Gln Leu Gln Pro Gln Asn Pro
Ser Gln Gln Gln Pro Gln Glu Gln Val Pro Leu
Val Gln Gln Gln Gln Phe Leu Gly Gln Gln Gln
Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro
Gln Pro Phe Pro Ser Gln Leu Pro Tyr Leu Gln
Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
Ser Gln Pro Gln Pro Phe Arg Pro Gln Gln Pro
Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Gln Tyr Ser Gln Pro
Gln Gln Pro Ile Ser Gln Gln Gln Gln Gln Gln
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
Gln Ile Leu Gln Gln Ile Leu Gln Gln Gln Leu
Ile Pro Cys Met Asp Val Val Leu Gln Gln His
Asn Ile Ala His Gly Arg Ser Gln Val Leu Gln
Gln Ser Thr Tyr Gln Leu Leu Gln Glu Leu Cys
Cys Gln His Leu Trp Gln Ile Pro Glu Gln Ser
Gln Cys Gln Ala Ile His Asn Val Val His Ala
Ile Ile Leu His Gln Gln Gln Lys Gln Gln Gln
Gln Pro Ser Ser Gln Val Ser Phe Gln Gln Pro
Leu Gln Gln Tyr Pro Leu Gly Gln Gly Ser Phe
Arg Pro Ser Gln Gln Asn Pro Gln Ala Gln Gly
Ser Val Gln Pro Gln Gln Leu Pro Gln Phe Glu
Glu Ile Arg Asn Leu Ala Leu Gln Thr Leu Pro
Ala Met Cys Asn Val Tyr Ile Pro Pro Tyr Cys
Thr Ile Ala Pro Phe Gly Ile Phe Gly Thr Asn

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso *in vitro* de una transglutaminasa microbiana inmunológicamente reactiva para el diagnóstico y/o control de terapia de enfermedad celíaca así como de sensibilidad al gluten, **caracterizado por que** un complejo inmunológicamente reactivo, formado por la transglutaminasa microbiana o partes de la misma y gliadina o péptidos parciales de la misma sirve para la detección de anticuerpos a partir de una muestra y estos anticuerpos son detectables, incluso antes de que sean detectables anticuerpos, que se forman frente a un complejo de transglutaminasa tisular y gliadina.
- 10 **2.** Uso *in vitro* según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la transglutaminasa microbiana presenta una secuencia de aminoácidos o partes de la misma con la SEQ. ID. NO: 1.
- 3.** Uso *in vitro* según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la gliadina presenta una secuencia de aminoácidos o partes de la misma con la SEQ. ID. NO: 2.
- 15 **4.** Uso *in vitro* según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la transglutaminasa microbiana pertenece al género *Streptomyces*.
- 20 **5.** Uso *in vitro* según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** para la detección de los anticuerpos unidos al complejo inmunológicamente reactivo a partir de una muestra se usa un procedimiento de inmunoensayo con el uso de anticuerpos para la detección de anticuerpos unidos al complejo inmunológicamente reactivo a partir de una muestra.
- 25 **6.** Uso *in vitro* según la reivindicación 5, **caracterizado por que** los anticuerpos para la detección son específicos del isotipo IgA, IgM, IgE y/o IgG.
- 7.** Uso *in vitro* según la reivindicación 5, **caracterizado por que** el procedimiento de inmunoensayo es un ELISA, RIA o inmunoensayo de fluorescencia, y/o por que la detección se realiza en una fase sólida o en una fase líquida.
- 30 **8.** Kit para la determinación de diagnóstico y/o control de terapia de enfermedad celíaca o espúe así de sensibilidad al gluten, **caracterizado por que** el kit presenta un complejo inmunológicamente reactivo de una transglutaminasa microbiana o una parte de la misma y gliadina o un péptido parcial de la misma, en el que el complejo inmunológicamente reactivo sirve para la detección de anticuerpos a partir de una muestra y estos anticuerpos son detectables, incluso antes de que sean detectables anticuerpos, que se forman frente a un complejo de
- 35 transglutaminasa tisular y gliadina y el kit comprende medios adicionales para la detección específica de anticuerpos unidos al complejo inmunológicamente reactivo a partir de una muestra.
- 9.** Kit según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la transglutaminasa microbiana presenta una secuencia de aminoácidos o partes de la misma con la SEQ. ID. NO: 1.
- 40 **10.** Kit según la reivindicación 8 o 9, **caracterizado por que** la gliadina presenta una secuencia de aminoácidos o partes de la misma con la SEQ. ID. NO: 2.
- 45 **11.** Kit según la reivindicación 8 a 10, **caracterizado por que** la transglutaminasa microbiana pertenece al género *Streptomyces*.
- 12.** Kit según una de las reivindicaciones 8 a 11, **caracterizado por que** los medios adicionales para la detección específica son anticuerpos para el isotipo IgA, IgM, IgE y/o IgG.
- 50 **13.** Kit según una de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizado por que** el kit comprende medios adicionales para la clasificación de enfermedad celíaca y/o espúe así como de sensibilidad al gluten en distintos subgrupos de enfermedades tales como los anticuerpos anti-tTg, anticuerpos anti-complejo de tTG/péptido de gliadina, anticuerpos anti-DGP, anticuerpos anti-gliadina, etc.
- 55 **14.** Kit según una de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado por que** el kit contiene adicionalmente anticuerpos monoclonales y/o policlonales y/o recombinantes aislados, que se unen específicamente a un complejo inmunológicamente reactivo de una transglutaminasa microbiana o una parte de la misma y gliadina o un péptido parcial de la misma.
- 60 **15.** Kit según una de las reivindicaciones 8 a 14, **caracterizado por que** el complejo inmunológicamente reactivo se forma a partir de una transglutaminasa microbiana o una parte de la misma y gliadina y/o un péptido parcial de la misma.

FIG. 1

Secuencia superior MTG; Secuencia inferior TG2

```
#####
# Programa: stretcher
# Fecha de ejecución: mi. 15 feb 2012 12:55:20
# Línea de comandos: stretcher
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_stretcher-I20120215-125459-0781-25279230-oy.asequence
# -bsequence emboss_stretcher-I20120215-125459-0781-25279230-oy.bsequence
# -datafile EBLOSUM62
# -gapopen 12
# -gapextend 2
# -aformat3 pair
# -sprotein1
# -sprotein2
# Align_format: pair
# Report_file: stdout
#####

#-----
#
# Aligned sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 12
# Extend_penalty: 2
#
# Longitud: 692
# Identidad: 99/692 (14,3%)
# Similitud: 163/692 (23,6%)
# Huecos: 287/692 (41,5%)
# Puntuación: -522
#
#-----

EMBOSS_001      1 MSQRGRTLVAALGAVMCTTALMPSAGAATGSGSGSGTGEE--KRSYAET      48
  |::  ||.....:|.....:.....|:  ...:|.
EMBOSS_001      1 MAEE---LVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWTLHFEG      47

EMBOSS_001     49 HRLTADDVDDINALNESAPAASS-AGPSFRAPDSDE-----            83
  ....|  ||:.....:|.|.  ||...|.|.|.
EMBOSS_001     48 RNYEAS-VDSLTFVVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQQ      96

EMBOSS_001     84 -----RVTPPAEP---LDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYI---RKW---Q    118
  :|.|.|.  |.:.....|......:..:|  ..|  .
EMBOSS_001     97 DCTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLFNAWCPAD    146

EMBOSS_001    119 QVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCV---GVTWVNSGQYPTNRLAFAFF    164
  .||.....:|:.....|:..:..|.  :|.  |.||:.....|.
EMBOSS_001    147 AVYLDSEEERQEYVLTQQGFYQGSAKFIKNIPW-NFQQFEDGILDICLI    195

EMBOSS_001    165 DEDKYKNELKN-GRPRSGETRAEFEGRVAKD-----                194
  ..|.....|||  ||.|.:.:..:..:|...
EMBOSS_001    196 LLDVNPFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVSVMVNCNDDQGVLLGRWDNNY    245

EMBOSS_001    195 -----SFDEAK-----GFQRR-----DVASVMNKAL-----    216
  |.|.:.  |.||:  .||:..:|.
EMBOSS_001    246 GDGVS PMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGCWVFAAVACTVLRCLGIPT    295

EMBOSS_001    217 -----ENAHDEGA-----YLDNLKKELANGNDAL-----RNE    243
  :|||:..:  |..|.|.|.:.:.....:  ...
EMBOSS_001    296 RVVTNYNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRP    345
```

ES 2 729 715 T3

EMBOSS_001	244	DARSPF--YSALRNTPSFKDRNGGNHDP SKMKAVI-----YSKHFWSG	284
		.:.: : : : 	
EMBOSS_001	346	DLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFA	395
EMBOSS_001	285	QDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLV-----DMSRDRNI	319
		:..... .:..:..: :.....	
EMBOSS_001	396	EVNADVVDWIQQDDG SVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITHTYKY	445
EMBOSS_001	320	PRSPSPGESFVNFDY-----GW-----FGAQTEADADKT V WTHG	354
	 : ...: 	
EMBOSS_001	446	PEGSSEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVGGSMNMGSDFDVFAHI	495
EMBOSS_001	355	NHYHAP-----NGSLGA-----MH	368
		:.:. . . . :.	
EMBOSS_001	496	TNNTAEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGTKYLLNLNLEPFSEKSVPLC	545
EMBOSS_001	369	VYESKFRNWS-----DGYSDFDRGAYV-----VTF	393
		:... : ... : : :..	
EMBOSS_001	546	ILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILG	595
EMBOSS_001	394	VPKS-----WNTAP-----	402
		
EMBOSS_001	596	EPKQKRKLVAEVS LQNP LPVALEGCTFTVEGAGLTEEQKTVEIPDPVEAG	645
EMBOSS_001	403	-----DKVKQ-----GWP	410
		: . ..	
EMBOSS_001	646	EEVKVRMDLLPLHMGLHKL VVNFESDKLKAVKGFRNVIIGPA	687

FIG. 2

Secuencia superior MTG; Secuencia inferior TG2

```
#####
# Programa: needle
# Fecha de ejecución: mi. 15 feb 2012 12:52:01
# Línea de comandos: needle
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_needle-I20120215-125159-0923-93477931-oy.asequence
# -bsequence emboss_needle-I20120215-125159-0923-93477931-oy.bsequence
# -datafile EBLOSUM62
# -gapopen 10.0
# -gapextend 0.5
# -endopen 10.0
# -endextend 0.5
# -aformat3 pair
# -sprotein1
# -sprotein2
# Align format: pair
# Report file: stdout
#####

#
# Aligned sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Longitud: 811
# Identidad: 75/811 (9,2%)
# Similitud: 124/811 (15,3%)
# Huecos: 525/811 (64,7%)
# Puntuación: 48,0
#
#-----
EMBOSS_001 1 -----MSQRGR---TLVFAALGA 15
EMBOSS_001 1 MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRRGQPFWLTLHFEGRNY 50
EMBOSS_001 16 VMCTTALMPS--AGAATGSGSGSGTGEEKRSYAETHRLTADDVDDIN--- 60
EMBOSS_001 51 EASVDSLTF SVVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQDCTL 100
EMBOSS_001 61 ALNESAPAASSAGPSFRAPDS DERVTPPAELDRMPDPYRPSYGRAETIV 110
EMBOSS_001 101 SLQLTTPANAPIG-----LYRLSLEASTGYQGS SFVL 132
EMBOSS_001 111 NNYI---RKW---QQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCV---GVTWVN 150
EMBOSS_001 133 GHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEVLTQQGFYQGS AKFIKNI PW-N 181
EMBOSS_001 151 SGQYPTNRLAF AFDEDKYNELKN-GRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEA 199
EMBOSS_001 182 FGQFEDGILDICLILLVNP KFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRV-----V 224
EMBOSS_001 200 KGFQRARDVASVMNKALENAHDEG----AYLDNLKKELANGNDALRNEDA 245
EMBOSS_001 225 SGMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVS PMSWIGSV-----DILRR--- 263
EMBOSS_001 246 RSPFYALRNTPSFKDRNGNHDP SKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRK 295
| :.....|
```

ES 2 729 715 T3

EMBOSS_001	264	-----W-----KNHGCQRVK	273
EMBOSS_001	296	YGDPEAFR-----PDRGTGLVMSRDRNIPRSPTSPGESFVNF	333
	: : :	
EMBOSS_001	274	YGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYN SAHDQN-----SNLLIEY	315
EMBOSS_001	334	DYGFQAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKERNWSDGYSD	383
		... :.: ...: ...:	
EMBOSS_001	316	FRNEFG-EIQGDKSEMIW-----NFHCWVE----	339
EMBOSS_001	384	FDRGAYVVT FVPKSWNTAPDKVK--QGWP-----	410
	: .	
EMBOSS_001	340	-----SWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVPV	376
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	377	RAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDW IQDDGSVHKSINRSLIVGLKI	426
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	427	STKSVGRDEREDITHYKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAKEETGMAMR	476
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	477	IRVGQSMNMGSDFDVFAHITNNTAEEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECGT	526
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	527	KYLLNLNLEPFSEKSVPLCILEKYRDCLETESNLIKVRALLVEPVINSYL	576
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	577	LAERDLYLENPEIKIRILGEPKQKRKLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEG	626
EMBOSS_001	411	-----	410
EMBOSS_001	627	AGLTEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMGLHKL VVNFESDKLKAV	676
EMBOSS_001	411	----- 410	
EMBOSS_001	677	KGFRNVIIGPA 687	

FIG. 3 Suero 1011 (IgA)

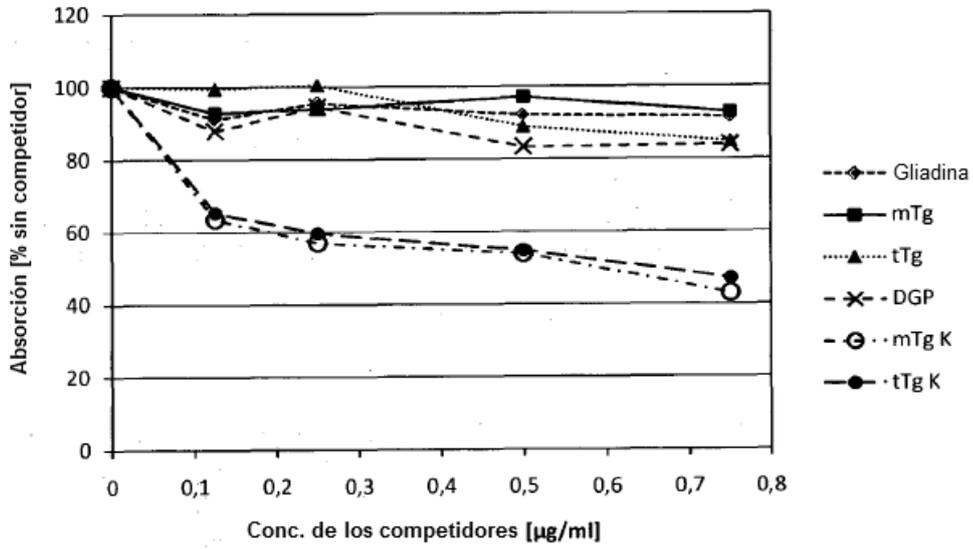


FIG. 4

Suero 1038 (IgA)

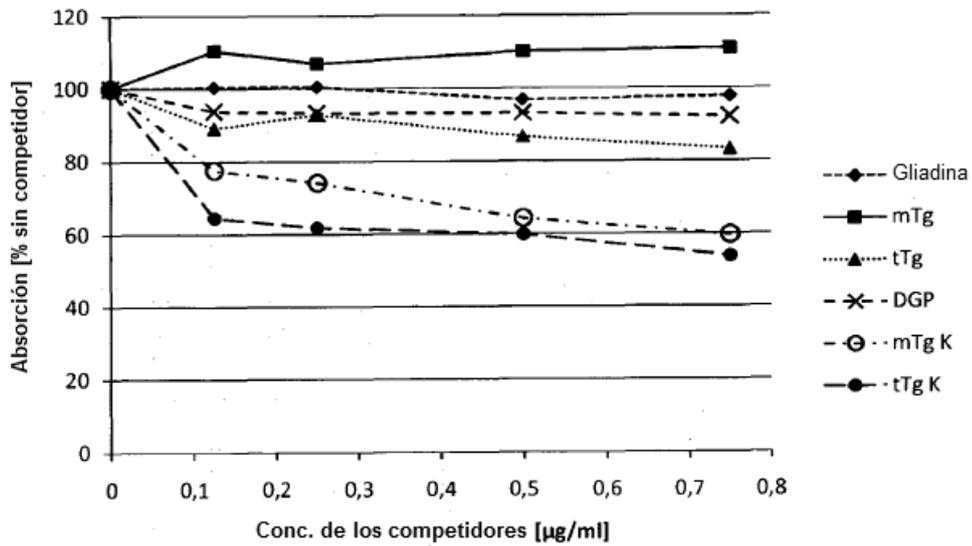


FIG. 5 Suero 1011 (IgG)

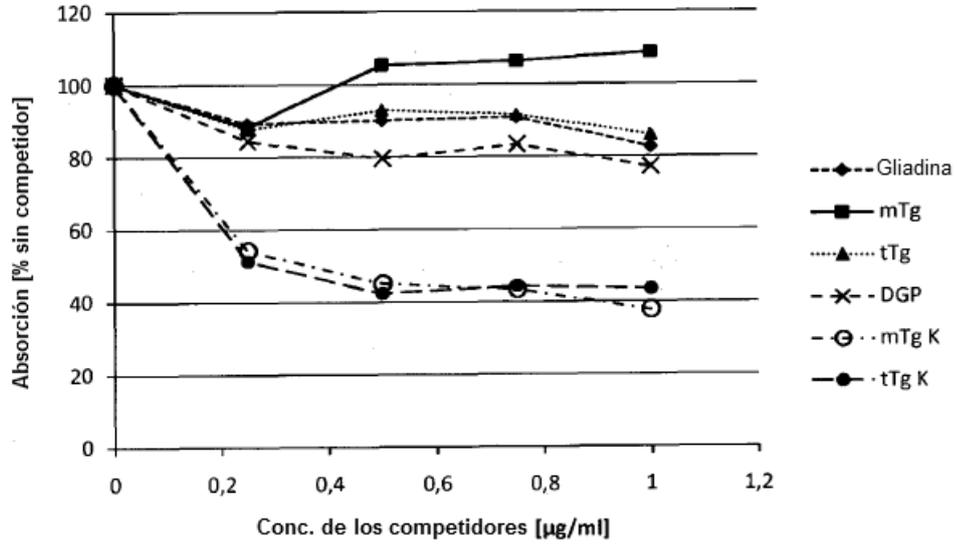


FIG. 6 Suero 1038 (IgG)

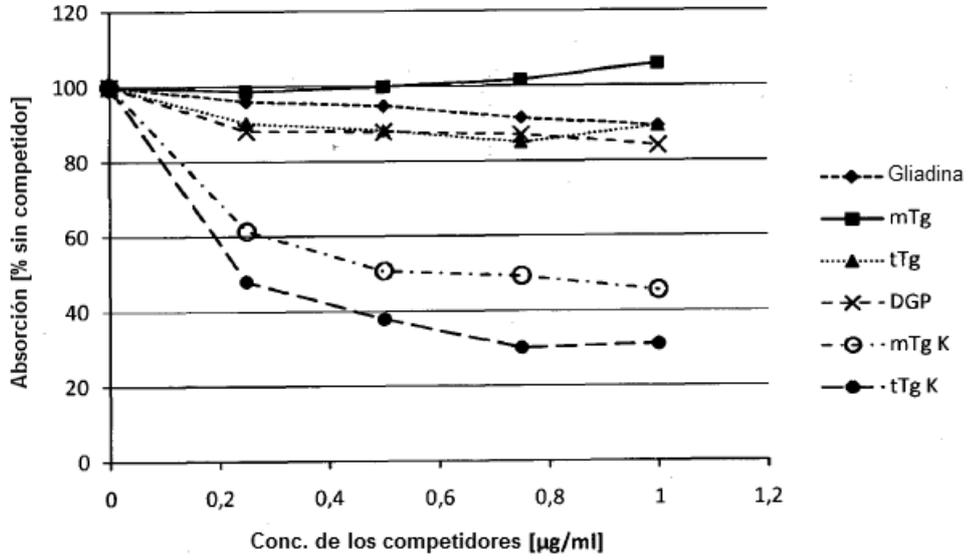


FIG. 7

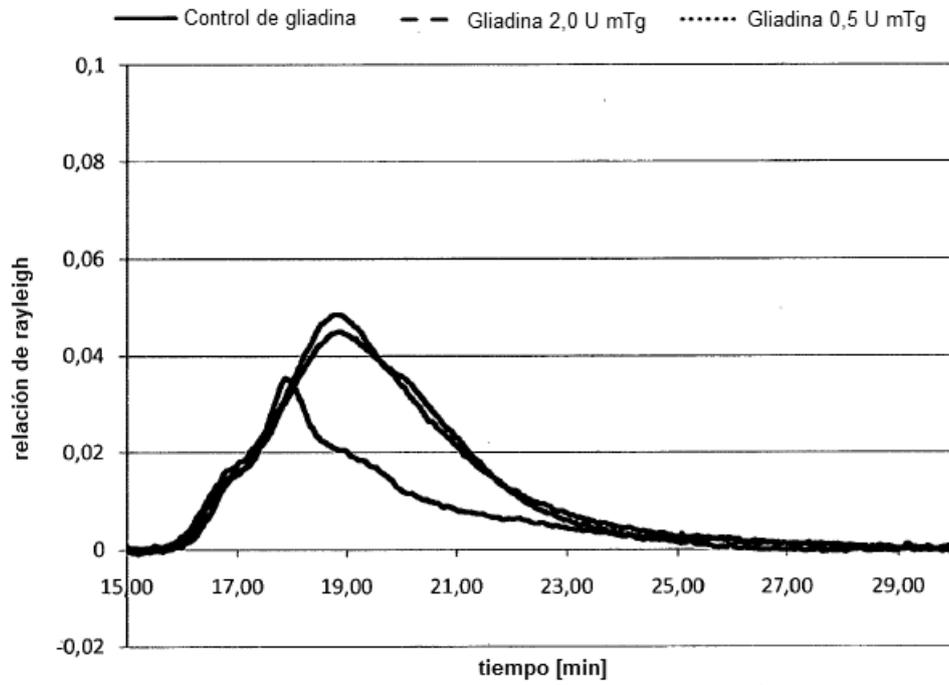


FIG. 8

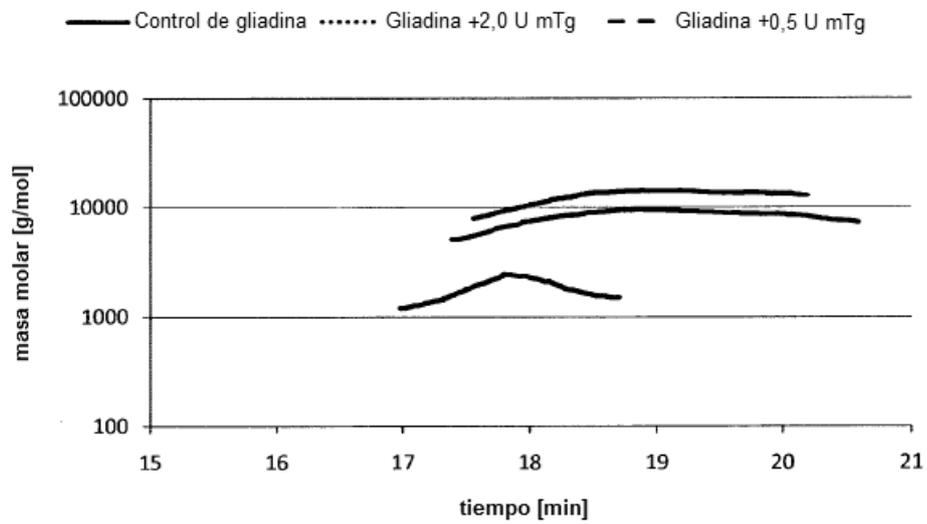


FIG. 9

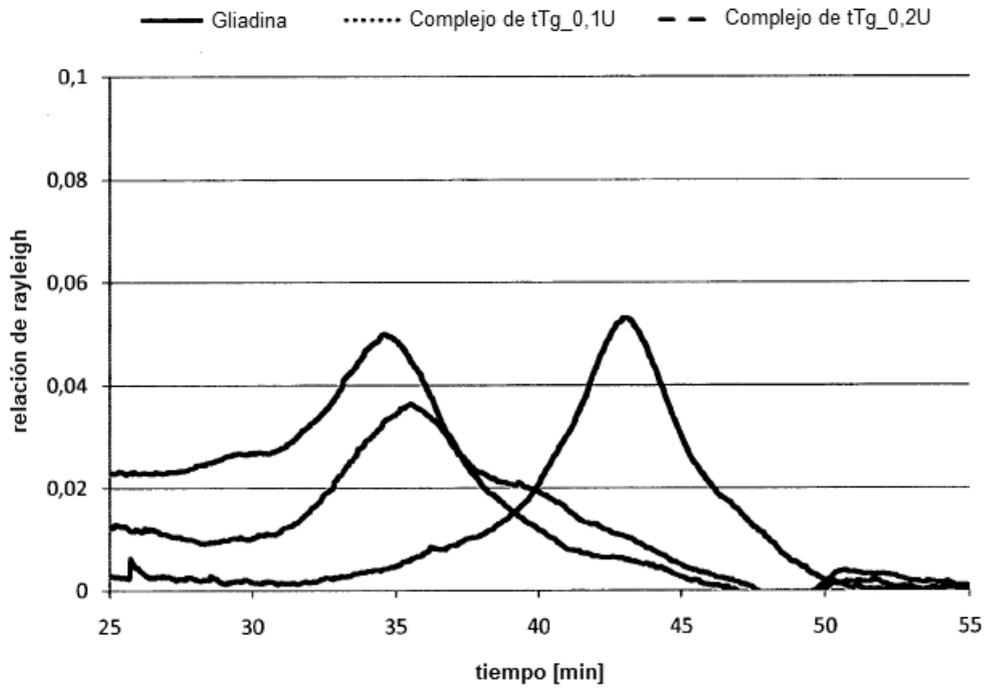


FIG. 10

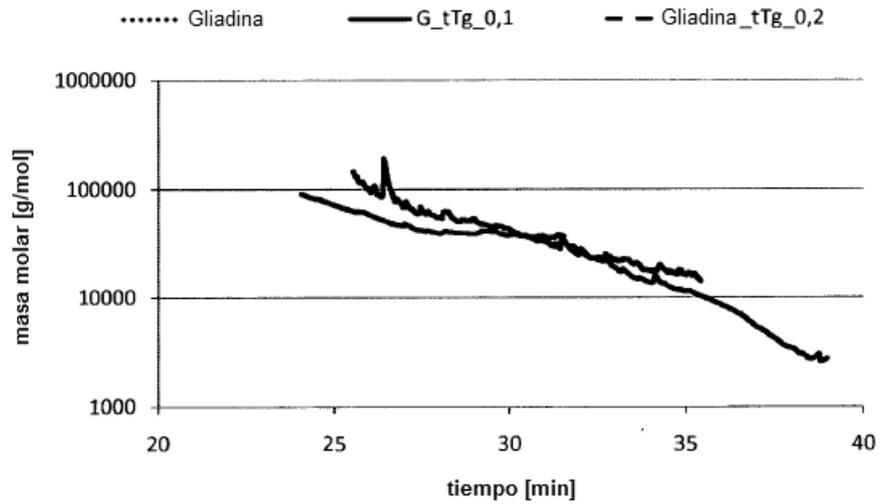


FIG. 11

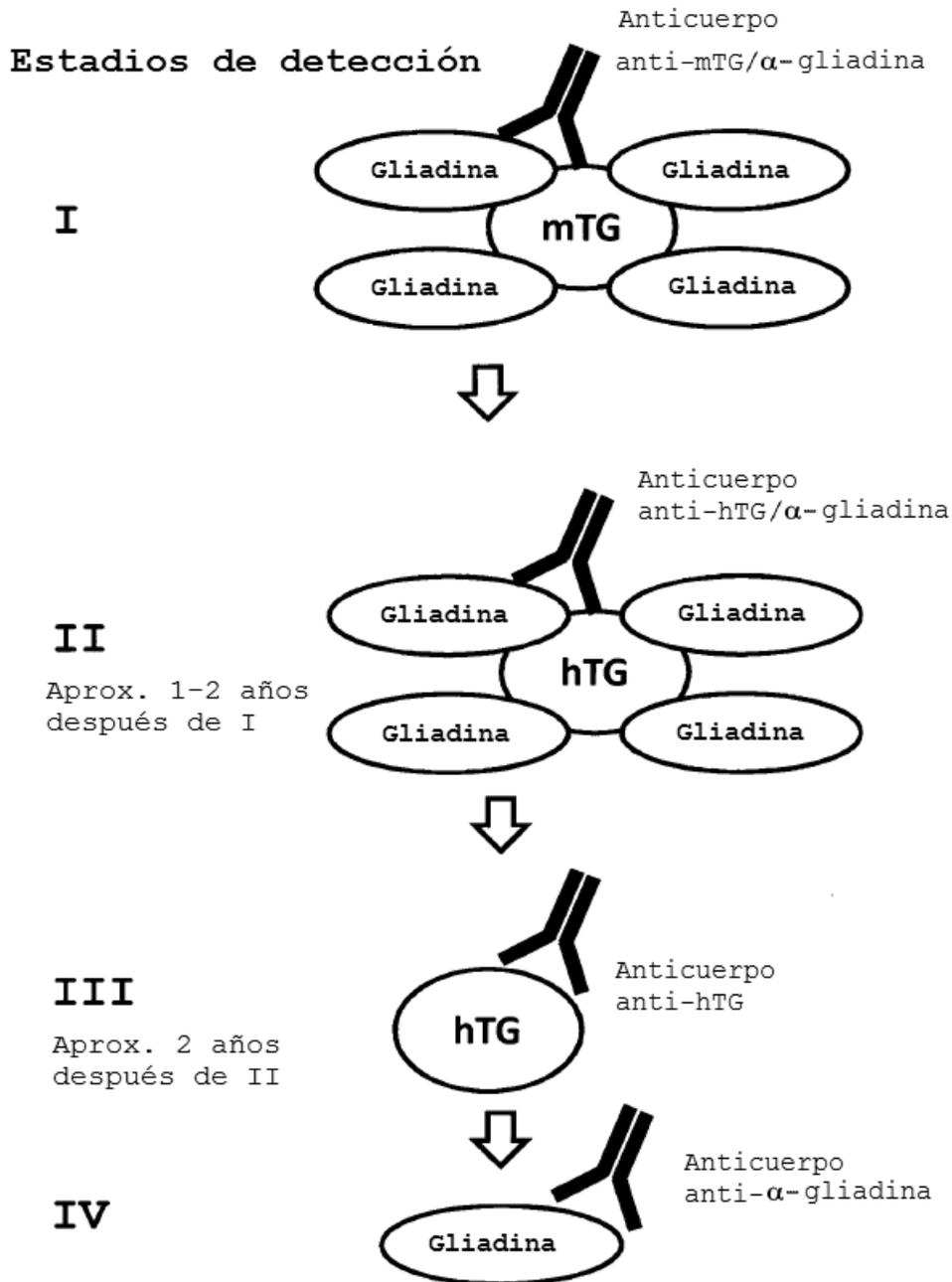


FIG. 12

