(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 982 932**

(21) Número de solicitud: 202330222

(51) Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

16.03.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.10.2024

(71) Solicitantes:

BIOMEDAL, SL (100.0%)
C/ Calzada Romana 40. Pl. Parque Plata.
41900 Camas (Sevilla) ES

(72) Inventor/es:

CEBOLLA RAMÍREZ, Angel

(74) Agente/Representante:

MARTÍNEZ, Miguel Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

(54) Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE PERMEABILIDAD INTESTINAL**

(57) Resumen:

Procedimiento para la determinación de la permeabilidad intestinal. La presente invención hace referencia a un método in vitro para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto y, consecuentemente, para el diagnóstico de enfermedades o disfunciones asociadas que cursan con hiper-permeabilidad intestinal. De forma más específica, el procedimiento permite medir usando un componente alimenticio común la cantidad de antígeno alimentario que puede atravesar un intestino de forma disfuncional. El procedimiento permite desarrollar productos y procesos analíticos en el marco de la industria de los dispositivos médicos.

ES 2 982 932 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE PERMEABILIDAD INTESTINAL

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo médico, análisis clínicos, producción y comercialización de productos y servicios sanitarios, así como la investigación básica y clínica sobre el sistema digestivo. Particularmente, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto y, consecuentemente, para el diagnóstico de enfermedades o disfunciones asociadas o que pueden cursan con hiper-permeabilidad intestinal tales como (lista no exhaustiva): enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, colitis microscópica dispepsia funcional, atrofia vellositaria crónica/aguda por tratamientos crónicos con algunos fármacos y/o hipersensibilidad alimentaria no mediada por IgE.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La barrera intestinal es fundamental en la salud humana y constituye la interfase entre el exterior y el medio interno del cuerpo. Una barrera intestinal funcional permite la absorción de nutrientes y líquidos, pero al mismo tiempo bloquea que sustancias nocivas como toxinas, bacterias o virus atraviesen el epitelio intestinal, y puedan dañar el organismo. Una permeabilidad intestinal alterada se ha asociado con varias condiciones crónicas como la enfermedad intestinal inflamatoria, el síndrome de intestino irritable, la enfermedad celíaca, y otras patologías que se originan en el tracto gastrointestinal, pero también enfermedades como Alzheimer y Parkinson.

Las vías de penetración de algunos antígenos insuficientemente digeridos o incluso bacterias y/o virus son la vía paracelular (a través del espacio intercelular presente entre las células) o la vía transcelular (atravesando de las células epiteliales del intestino). El incremento de la permeabilidad intestinal a macromoléculas está asociado a una variedad de condiciones inflamatorias.

El lado luminal del intestino está revestido por células epiteliales, que promueven la absorción de agua y nutrientes; el epitelio también proporciona una barrera dinámica y semipermeable entre la microbiota luminal y el huésped. La barrera está formada por membranas de células epiteliales individuales y proteínas de unión estrecha que sellan el espacio paracelular entre células adyacentes. Por tanto, la permeabilidad de esta barrera está

regulada por la integridad de las membranas plasmáticas celulares y de las uniones estrechas, así como por los procesos de las células epiteliales que median la secreción y la absorción. Las moléculas pequeñas (<300 Da) y los electrolitos cruzan pasivamente la barrera de unión estrecha.

La permeabilidad de la membrana se puede ver alterada por algunos estímulos fisiológicos y patológicos. Durante la homeostasis, el epitelio intestinal absorbe nutrientes mientras previene eficazmente la translocación de bacterias intraluminales. Sin embargo, algunas condiciones patológicas (p. ej., toxinas o inflamación intestinal) pueden aumentar el transporte paracelular e incrementar la permeabilidad de la barrera intestinal, lo que presenta el riesgo de una absorción de nutrientes ineficaz y una falla en la prevención de la translocación de bacterias luminales y sus productos (también llamados patrones moleculares asociadas a patógenos o PAMP). Esto puede provocar enfermedades intestinales crónicas, así como afectar a órganos distales que drenan y filtran las bacterias translocadas y los PAMP asociados.

La hiper-permeabilidad intestinal puede causar inflamación sistémica, la cual puede conducir a varias condiciones clínicas incluyendo:

- Alergias o sensibilidades alimentarias.
- Sensibilidad al gluten y enfermedad celiaca.
- Enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa).
- Enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis, diabetes tipo I, espondilitis, etc.).
- Disfunción cognitiva (ansiedad, depresión, esquizofrenia, etc.).
- Condiciones neurológicas (Síndrome de Guillain-Barré, esclerosis múltiples, etc.).

Los métodos conocidos para determinar la permeabilidad intestinal más comunes son:

1. El test de lactulosa/manitol o lactitol/manitol, que existe desde hace más de 40 años y mide la capacidad de dos moléculas de azúcar o derivados de atravesar el epitelio intestinal: lactulosa (un isómero de lactosa) y manitol. El manitol es una molécula de azúcar pequeña que es fácilmente absorbida, mientras que lactulosa es una molécula más grande que no es absorbida de forma efectiva. Tras la recolección de una muestra de orina de control basal, el paciente ingiere lactulosa y manitol. A continuación, se cuantifica la concentración de lactulosa y manitol en la orina recogida durante las 6 horas posteriores a la ingesta. Es un método económico y de fácil realización, ya que las muestras de orina se

pueden recoger en el domicilio del paciente. Sin embargo, tiene como inconvenientes que mide la permeabilidad de pequeñas moléculas de azúcares que no tienen actividad inmunogénica, por lo que no permite analizar la capacidad de macromoléculas antigénicas de pasar la barrera epitelial, las cuales causan y exacerban las condiciones inflamatorias subyacentes, y las enfermedades autoinmunes. La lactulosa tiene además bajo peso molecular, y la transferencia de esta sustancia a través de la barrera intestinal no refleja la transferencia de proteínas alimentarias y el conjunto de la respuesta inmune. Además, la ingestión de lactulosa puede exacerbar los síntomas asociados al sobrecrecimiento bacteriano (SIBO), considerándose además como un prebiótico. Por otra parte, requiere de técnicas, algunas de ellas complejas, como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases o espectrometría de masas tándem (MS/MS). Por último, es necesario que el paciente realice una dieta compleja debido a la elevada presencia de manitol de forma natural en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras y legumbres, entre otros).

2. Los indicadores macromoleculares de permeabilidad intestinal, que permiten la valoración de moléculas que pueden ser antigénicas. La presencia de anticuerpos específicos frente a dichas moléculas podría revelar un posible incremento de la permeabilidad intestinal en algún evento pasado. Entre ellas se encuentran:
    a. Lipopolisacáridos (LPS) son moléculas grandes que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gran-negativas. Son endotoxinas y si se absorben provocan una fuerte respuesta inmune. La detección por anticuerpos de LPS indica infiltración de las endotoxinas a través de la barrera intestinal a la circulación sistémica.
    b. Ocludina es un componente mayoritario de las proteínas que mantienen las uniones estrechas entre células intestinales. La detección por anticuerpos frente a dichas ocludinas indicaría rotura de las uniones estrechas (ruta paracelular).
    c. Zonulina. Se ha propuesto que es una proteína que regula la permeabilidad intestinal. La detección por anticuerpos contra zonulina indica que la regulación de las uniones estrechas está deteriorada (ruta paracelular).
    d. La red de actomiosina es un complejo proteico que regula la función de la barrera intestinal manteniendo la plasticidad de las uniones estrechas.

Los anticuerpos frente a la actomiosina son biomarcadores de la desregulación de la barrera intestinal vía infiltración celular (ruta transcelular).

e. El LBP (proteína de unión a lipopolisacáridos). Se ha determinado que esta proteína se une al LPS, y se puede medir en sangre.

Se ha sugerido que estos indicadores permiten identificar el nivel de intestino permeable y sus causas (LPS o sobrecrecimiento bacteriano *vs* estrés o sensibilidad alimentaria).

Generalmente, cuanto más grande sea la molécula, menos probable es que tenga acceso a la circulación sistémica. Las mediciones de anticuerpos están influenciadas por el uso de esteroides. Por lo tanto, el paciente tiene que dejar de usarlos de forma oral o vía tópica durante al menos 60 días antes del análisis. Los valores de referencias además están solo basados en adultos, esto lo hace complicado de aplicar cuando se usa para población pediátrica porque no existen rangos de valores normales conocidos.

3. Medidas directas de zonulina en suero o sangre. La zonulina circulante (vs. anticuerpos frente a zonulina) no muestra falsos negativos con el uso de esteroides orales o tópicos, pero podría incrementarse su nivel con el uso de corticosteroides dando potenciales falsos positivos para la permeabilidad intestinal. Los niveles de zonulina son altos en personas obesas y en intolerancia a la glucosa, mostrando potenciales falsos positivos para la permeabilidad intestinal.

Por todo ello, lo ideal es encontrar un método para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal que esté basado en proteínas o péptidos inmunogénicos procedentes de alimentos habitualmente ingeridos para monitorizar enfermedades asociadas a cambios de permeabilidad.

La presente invención se dirige a solventar estos problemas técnicos relativos a las metodologías actuales (que no miden la capacidad de entrada de péptidos antigénicos alimentarios, son más invasivos, costosos, indirectos y/o laboriosos) y propone una nueva estrategia para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

La presente invención hace referencia a un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto y, consecuentemente, para el diagnóstico de enfermedades o disfunciones asociadas o que cursan con hiper-permeabilidad intestinal incluyendo enfermedades como la enfermedad celiaca, la enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, colitis microscópica dispepsia funcional, atrofia vellositaria crónica/aguda por tratamientos crónicos con algunos fármacos, hipersensibilidad alimentaria no mediada por IgE, y también como factor de riesgos de algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple.

Actualmente, no es posible realizar de forma satisfactoria una determinación de los valores de referencia individuales y sus alteraciones en la permeabilización intestinal a moléculas grandes como proteínas o grandes péptidos alimentarios con capacidad inmunogénica.

Así, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para determinar el grado de permeabilidad intestinal, mediante el siguiente procedimiento general secuencial:

- Paso 1: Mantener una dieta sin gluten durante al menos 16 horas, preferentemente 32, en las que al menos las últimas 8 sean en ayuno.
- Paso 2: Ingerir una cantidad definida de gluten en polvo en suspensión o hidrolizado, (al menos 0,5 g, y preferentemente 10g) en un medio fluido (agua, batido, yogurts, etc.).
- Paso 3: Recolectar todas las orinas durante al menos 8 horas, en las que durante al menos 4 horas se sigue manteniendo el ayuno y la dieta sin gluten.
- Paso 4: Medir el volumen de orina recolectado y la cantidad de gluten en la orina recolectada con un procedimiento que detecte menos de 15 ng/ml de gliadina (como proteína que se usa como patrón analítico del gluten) en orina.
- Paso 5: Comparar los valores de gluten excretado con unos valores de referencias internos (del mismo individuo) o promedios de individuos sanos y otros de referencia con permeabilidad a péptidos del gluten alterado. Si hay más péptidos del gluten en la orina del valor de referencia interno, significa que el individuo no ha mejorado su permeabilidad intestinal. Si se compara con el promedio correspondiente de su grupo de estudio de referencia (edad, género) y da un valor superior de péptidos del gluten a los márgenes de normalidad, el individuo tendrá

hiper-permeabilidad intestinal. Si está dentro de los márgenes de referencia el intestino no tiene signos de hiper-permeabilidad.

La dieta previa sin gluten del paso 1 se realiza para asegurar que todos los péptidos del gluten se originen del gluten ingerido en suspensión del paso 2, no de alimentos consumidos en las horas previas a la ingesta. Las 8 horas de ayuno previas a la ingesta también aseguran que el estómago quede vacío de restos alimenticios, así como en la parte de intestino delgado que conecta con el yeyuno, es decir, el duodeno. Prolongar el ayuno durante más de 8 horas disminuye la probabilidad de interferencia con otros alimentos en la metabolización del gluten ingerido en el paso 2. La eliminación del gluten de la dieta durante al menos las 24 horas previas a la ingesta disminuye las probabilidades de tener restos de gluten de otros alimentos previamente ingeridos, aunque una restricción de 16 horas suele ser suficiente para eliminar todo el gluten detectable por orina por los métodos disponibles comercialmente (por ejemplo, el Gluten Detect de Biomedal, Sevilla). El gluten administrado se suministra en cantidades de al menos 0.5 g para garantizar su detección en orina y en polvo o hidrolizado para aumentar la velocidad de digestión y absorción por el intestino al tener alta superficie de contacto con los agentes hidrolíticos del sistema digestivo. Para facilitar la ingesta en los individuos analizados y hacerla más agradable, la suspensión de gluten podría hacerse en agua usando además agentes dispersantes y saborizantes, o en otros fluidos como batidos, yogurt, etc. El gluten puede ser hidrolizado en una hidrólisis enzimática pepsino-tripsinada o en una digestión enzimática que permita solubilizarlo sin destruir la mayoría de los péptidos immunogénicos del gluten (GIP) que pueden detectarse por métodos inmunológicos existentes en el mercado. Preferentemente, se debe usar un preparado de gluten de 4-40 g para poder tener niveles de péptidos de gluten en orina lo suficientemente altos como para poder cuantificar GIP con los métodos disponibles comercialmente, como las tiras de flujo lateral (LFIA) iVYCHECK GIP Urine cuantificadas por un lector de LFIA (Biomedal, España), y otros métodos que se pueden aplicar en laboratorios clínicos de pequeño tamaño e incluso puntos cercanos al paciente (*Point of Care*).

Tras la ingesta del gluten, es preferible que el paciente permanezca en ayunas durante un periodo de 2 a 9 horas, de manera que se favorezca la digestión y metabolización del gluten ingerido.

Simultáneamente a mantener la dieta sin gluten, se recogen todas las orinas posteriores a la ingesta del preparado de gluten durante un periodo fijo de mínimo de 8 horas, pero extensible

hasta las 16 horas en casos que se requiera recoger la mayoría de los péptidos del gluten excretados en orina, de forma que sea residual los excretados posteriormente. Idealmente el periodo de recogida tras la ingesta serían las orinas desde 6 a 8 de la mañana, hasta las 22:00-00:00 de la noche, con una dieta previa sin gluten durante 24-36 horas y un ayuno de mínimo 8 horas. Se mide el volumen de orina excretado en ese periodo usando un recipiente de recogida de orina graduado o una probeta. De esa orina recolectada durante 8 a 16 horas, se determinaría la concentración de péptidos del gluten con un método cuantitativo.

En una forma preferente de la invención, los métodos de determinación de péptidos del gluten podrían usar anticuerpos específicos para proteínas del gluten ya descritos, sobre todo los que ya han demostrado determinar cuantitativamente gluten en alimentos con alta sensibilidad (capaces de detectar menos de 15 ng/ml de gliadina) y han demostrado su capacidad para detectar péptidos del gluten en orina, como el G12, A1 (Biomedal, España) y R5 (r-Biopharma, Alemania, o Eurofins Ingenasa, España). Se podrían también obtener realizando los procedimientos habituales de obtención de anticuerpos, inmunizando animales con péptidos con aquellas secuencias que se encontraron más abundantemente cuando se analizaron péptidos del gluten en orina por cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS) (**Tabla 1**).

Tabla 1

Identificador	Secuencia
SEQ ID NO: 1	LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF
SEQ ID NO: 2	QPQLPY
SEQ ID NO: 3	QPQLPF
SEQ ID NO: 4	QPQLPL
SEQ ID NO: 5	QQPFPQP
SEQ ID NO: 6	QLPYPQP
SEQ ID NO: 7	QLPFPQ
SEQ ID NO: 8	QQPYPQP
SEQ ID NO: 9	QPQPLY
SEQ ID NO: 10	FPLQPQQP
SEQ ID NO: 11	FPLEPEEP

Los anticuerpos obtenidos, serían válidos siempre y cuando los límites de cuantificación del procedimiento analítico sean preferiblemente inferiores a 15 ng/ml de gliadina, aunque las concentraciones muy reducidas de péptidos del gluten en orina requieren que los límites de detección sean inferiores a 6 ng de péptido SEQ ID Nª 1 (33mer de la α-gliadina)/ml para ser capaz de detectar el nivel de péptidos específicos del gluten en orina tras ingesta de 0,5-5 g de gluten.

Para preparar la muestra de orina e incrementar la sensibilidad de detección, podrían aplicarse, además, en una forma de la invención, sistemas de concentración de péptidos en orina. Algunas concentraciones preparativas de los péptidos del gluten que han demostrado ser efectivas incluyen extracción en fase sólida usando matrices con C18, cromatografía de exclusión molecular, evaporación de disolvente, cromatografía de afinidad, etc.

Los métodos preferentes para detectar gluten en la orina comprenderían el ELISA sándwich que cuantifica la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo mediante el acoplamiento de uno de los anticuerpos específicos a un enzima que puede usar reactivos colorimétricos, fluorimétricos o quimioluminiscentes para poder enviar una señal medible proporcional a la formación de inmunocomplejos con los péptidos del gluten. Los métodos fluorimétricos o quimioluminiscentes son de hecho más convenientes de aplicación por tener un rango dinámico más amplio, y no requieren realizar diluciones para entrar en rangos como cuando se usan métodos colorimétricos.

También se contemplaría en una forma de presentación de la invención preferente, tiras inmunocromatográficas de flujo lateral que pudiesen cuantificarse con un lector de tiras por análisis de imagen con partículas de oro o poliestireno coloreadas, usando sondas fluorigénicas clásicas o de fluorescencia de resuelta en el tiempo (*time-resolved fluorescence*) como las que se consiguen con partículas de europio, que pudiesen ser cuantificadas por un aparato fluorimétrico adecuado. Existen otras opciones como Heatsens o Quantum dots que pueden ser usadas como opciones de cuantificación de señal acoplando la sonda adecuada al anticuerpo.

En una forma alternativa de la invención en vez de anticuerpos pueden usarse también aptámeros desarrollados para reconocer el gluten en matrices biológicas como se ha desarrollado ya para alimentos.

El procedimiento de la invención podría facilitarse en una forma preferente con un kit que contenga el gluten en polvo en cápsulas de gelatina, o en sobres con agentes dispersantes y/o

saborizantes que contuviesen al menos 0,5 g de gluten, preferentemente entre 4 y 40 g de gluten, y más preferiblemente entre 8 y 10 g de gluten. Con dicha cantidad de gluten la excreción de gluten es detectable por al menos uno de los métodos disponible comercialmente. Por ejemplo, por métodos de LFIA ya comercializados por Biomedal (iVYCHECK GIP Urine) basados en anticuerpos sensibles y específicos frente al 33-mer de la alfa-gliadina, consiguiendo niveles en orina tras ingesta de 0,5 g por encima del límite de detección en la inmensa mayoría de los individuos (87%). Se ha descrito que 0,5 g de gluten no provoca síntomas en la mayoría de los celiacos, por lo que estas cantidades podrían usarse en casos de celíacos que teman la aparición de síntomas. En cualquier caso, para la máxima eficacia del procedimiento de la invención, es recomendable utilizar al menos 4 g para tener suficiente cantidad de gluten varias veces por encima de los niveles de detección del método disponible comercialmente en la mayoría de los individuos independientemente del grado de permeabilidad intestinal. Los estudios de población celiaca muestran que no tienen más riesgo de mortalidad que la población normal. La ingesta de gluten es frecuente en la mayoría de los celíacos, ya que entre el 67 y el 89% de los celiacos ingieren gluten al menos una vez a lo largo de una semana o un mes, respectivamente. Las ingestas puntuales de gluten parecen ser menos dañina que una ingesta de menos cantidad, pero más frecuente.

Otros componentes opcionales del kit podrían ser al menos un recipiente de recolección de orina excretada durante al menos las siguientes 8 horas desde la ingesta de gluten, preferentemente entre 8 y 16 horas, con capacidad hasta 2 l, aunque con solo 1,2 l de capacidad total entre todos los recipientes debería ser suficiente para ese periodo. Los péptidos del gluten son estables en orina, y podrían ser enviados a temperatura ambiente al laboratorio de análisis. Finalmente, otro componente del kit sería el método de determinación de los péptidos del gluten. La posibilidad de usar LFIA para cuantificar permitiría hacerlo en centros sanitarios cercanos al paciente con un lector que podría añadirse en una forma preferente de la invención, aunque pueden usarse métodos de laboratorio cuantitativos como el ELISA, Luminex®, CLIA (chemiluminescence immunoassays), biosensores, etc.

En una forma más avanzada del procedimiento de la invención, los péptidos del gluten en orina pueden fraccionarse mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) o usando filtros de tamaños moleculares tipo Centricon®, Amicron®, o cualquier dispositivo que pueda separar los péptidos correspondientes a dos tamaños moleculares. Preferiblemente, el procedimiento tendría entre un mínimo de 1 kDa (para poder ser detectable por métodos inmunológicos y contenga dos epítopos) y máximo 30 kDa, el orden de magnitud del tamaño

de la gliadina. La ratio entre el péptido de gluten total en orina y el que estaría en cada fracción sería un factor que permitiría conocer la cantidad de péptidos de tamaños moleculares altos que habría en la orina, y consecuentemente del grado de permeabilidad intestinal a péptidos de determinado tamaño. Estos estudios más detallados podrían realizarse en individuos donde se requiera más información para determinar su enteropatía o grado de evolución de la permeabilidad intestinal.

Se medirá la cantidad de péptidos de gluten en la orina de dichos individuos mediante un método inmunológico con anticuerpos específicos que cuantifiquen péptidos del gluten resistentes a digestión intestinal con epítopos capaces de ser detectados en la orina de dichos individuos. La cantidad de péptidos del gluten excretados en orina podrán ser comparados con los valores de referencia. Estos valores de referencia se generarían a partir de ensayos con una población sin patología digestivas o condiciones que perjudiquen su permeabilidad intestinal. Alternativamente los valores obtenidos en el primer ensayo con un individuo que se someta al procedimiento de la invención, pueden ser un valor de referencia propio a tener en cuenta para determinar la evolución de su permeabilidad intestinal a lo largo de un tratamiento o por una enfermedad crónica que se esté evaluando o monitorizando. Una mayor cantidad de péptidos del gluten detectada respecto a los valores basales o de referencia indicarían una permeabilidad intestinal aumentada, mientras que la disminución de dichos valores indicaría normalización de la permeabilidad intestinal.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención es un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto que comprende: a) administrar vía oral al sujeto entre 0,5 y 40 g de gluten, o una fuente del mismo, después de un ayuno de al menos 8 horas, y tras una dieta sin gluten de al menos 16 horas, b) determinar la cantidad de péptidos del gluten presente en orina excretada durante al menos las siguientes 6 horas a partir de la ingesta de gluten (es decir, a partir de la administración realizada en la etapa a)), donde la presencia de una cantidad de gluten determinada en el paso b) significativamente superior a los valores de referencia preestablecidos es indicativo de permeabilidad intestinal incrementada.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades que cursan con hiper-permeabilidad intestinal seleccionadas del grupo que comprende: síndrome de intestino permeable, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, colitis microscópica dispepsia funcional, atrofia

vellositaria crónica/aguda por tratamientos crónicos con algunos fármacos y/o hipersensibilidad alimentaria no mediada por IgE, que comprende determinar la permeabilidad intestinal en un sujeto siguiendo el método anterior.

En una realización preferida de la invención la fuente de gluten se proporciona en una suspensión acuosa con al menos 2 g de gluten.

En una realización preferida de la invención la determinación de la cantidad de los péptidos del gluten se lleva a cabo de forma directa a través de un inmunoensayo para la detección de los propios péptidos del gluten, o de forma indirecta mediante la detección de autoanticuerpos frente a los péptidos del gluten.

En una realización preferida de la invención el inmunoensayo comprende anticuerpos frente a péptidos del gluten que comprenden las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y/o sus derivados.

En una realización preferida de la invención la determinación de la cantidad de los péptidos del gluten se lleva a cabo a través de un inmunoensayo seleccionado entre: ELISA, LFIA, CLIA o biosensores.

En una realización preferida de la invención los péptidos del gluten se concentran mediante sistemas de extracción de uno de los tipos siguientes: LFIA, ELISA, CLIA, SIMOA, Luminex, turbidometría o inmunocromatofragía.

El tercer aspecto de la presente invención es un kit de partes para realización del método anterior que comprende:

a. Formulación con 0,5 a 40 g de gluten.
b. Envase recolector de orina.
c. Test inmunológico que comprenda anticuerpos que puedan formar complejos con los péptidos inmunogénicos del gluten y detectarse por métodos turbidimétricos, visuales, colorimétricos, fluorimétricos, quimioluminiscentes, y detección térmica.

En una realización preferida de la invención el test inmunológico consiste en una tira reactiva de flujo lateral con anticuerpos frente a péptidos inmunogénicos del gluten.

En una realización preferida de la invención el test inmunológico consiste en un ensayo ELISA, LFIA, CLIA o por micropartículas magnéticas o fluorescentes o fosforescente.

El cuarto aspecto de la presente invención hace referencia a un péptido de gluten caracterizado porque comprende o consiste en las secuencias: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y/o sus derivados; o anticuerpos reactivos frente a dichos péptidos o sus derivados.

En una realización preferida de la invención el péptido o anticuerpo se usa en un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto.

En una realización preferida de la invención el péptido o anticuerpo se usa en un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto que comprende: a) administrar vía oral al sujeto entre 0,5 y 40 g de gluten, preferentemente entre 4 y 10 g, o una fuente del mismo, después de un ayuno de al menos 8 horas, y tras una dieta sin gluten de al menos 16 horas, y b) determinar la cantidad de péptidos del gluten presente en orina excretada durante al menos las siguientes 6 horas a partir de la ingesta de gluten, donde la presencia de una cantidad de gluten determinada en el paso b) significativamente superior a los valores de referencia preestablecidos es indicativo de hiper-permeabilidad intestinal (es decir, permeabilidad intestinal incrementada).

En el contexto de la presente invención los siguientes términos o expresiones son definidas para una mejor interpretación del alcance de esta:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Así, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos sean opcionales y pueden o no estar presentes.
- El término "que consiste en" significa que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "consistente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- El término "valores de referencia preestablecidos", cuando se refiere a la cantidad de gluten determinada en la presente invención, hace mención a la cantidad observada en individuos sanos, particularmente en el estado inicial del mismo individuo antes de un tratamiento. En un aspecto preferido, el valor de referencia se mide en un primer

ensayo inicial realizado al sujeto, sobre los resultados de un conjunto de población sin enteropatías o sobre los resultados de un conjunto de población sin enteropatías del mismo rango de edad del individuo cuya permeabilidad intestinal se quiere analizar. Es probable que el sujeto tenga hiper-permeabilidad intestinal, con una sensibilidad y especificidad determinadas, si la cantidad de gluten determinada en la orina del sujeto está por encima de dicho "nivel de referencia preestablecido". Un valor de "referencia" puede ser un valor umbral o un valor de corte que puede determinarse de forma experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto en la materia. El valor del umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y la especificidad óptimas según la función de la prueba y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de los falsos positivos y negativos). Normalmente, la sensibilidad y la especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) pueden determinarse mediante una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) basada en datos experimentales.

Descripción de las figuras

Figura 1. Clasificación del estado de atrofia vellositaria de la mucosa intestinal. Vh:Cd (*Villus height, crypt depth*) es el ratio medio entre la altura de la vellosidad intestinal y la profundidad de la cripta. A partir de 2 se considera un estado de la vellosidad intestinal según clasificación de Marsh como 0 a 2, con ninguna o leve atrofia intestinal. Con menos de 2 se considera Marsh 3, existiendo grados desde 3a a 3c, que implicaría severa atrofia intestinal.

Figura 2. Dependencia de la concentración de péptidos inmunogénicos del gluten en orina y grados de atrofia vellositaria. Todos los pacientes ingirieron 3 g de gluten contenidos en una barrita energética. VH:CD es la ratio entre la altura del villus a la profundidad de la cripta. LOQ= Limite de cuantificación (2,5 ng/ml).

Figura 3. Comparación del promedio de excreción de GIP en individuos celiacos según el grado de atrofia vellositaria en biopsias realizadas tras el periodo de ingestas diarias de 3g de gluten prolongados al menos 2 meses.

Figura 4. Dinámica de excreción de péptidos del gluten en individuos sin enteropatías conocidas tras la ingesta de 8 g de gluten en polvo en ayunas.

Figura 5. Dinámicas de excreción de lactulosa excretada del total ingerido en individuos sin enteropatías conocidas (n=15), expresado en ppm.

Figura 6. Correlación entre la excreción de GIP y las ratios de excreción lactulosa/manitol en los 15 voluntarios que ingirieron 8 g de gluten en ayunas. $R^2 = 0,51$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A continuación, se muestran Ejemplos de realización de la invención con el objetivo de ilustrar la misma y sin intención de limitar el grado de protección.

Ejemplo 1. Variación de la concentración de péptidos del gluten en orina en individuos celiacos con distinto grado de atrofia vellositaria.

El presente ejemplo muestra cómo los resultados de estudios clínicos muestran que el grado de atrofia vellositaria en enfermos celiacos hacen que aumenten los valores de excreción de GIP en orina (u-GIP) para una ingesta continua, incluso sin controlar la ingesta de otros alimentos o el tiempo de recogida de la orina. A nivel estadístico se pueden ver variaciones significativas en la concentración de péptido dependiendo del grado de atrofia vellositaria del duodeno. En este estudio se le suministraron cantidades de gluten idénticas durante unos días previos o posteriores a una biopsia duodenal, que proporcionaba datos del estado de atrofia vellositaria en individuos celiacos midiendo el ratio medio de la altura de las vellosidades frente a la profundidad de las criptas (Vh:Cd).

Los sujetos analizados (pacientes celíacos) recibieron cantidades de gluten idénticas (3 g en forma de barrita energética) diariamente durante seis semanas posteriores a una biopsia duodenal, que proporcionaba datos del estado de atrofia vellositaria midiendo la ratio medio de la altura de las vellosidades frente a la profundidad de las criptas.

Se observó que la concentración de péptidos inmunogénicos del gluten detectables en inmunoensayos era significativamente mayor cuanto más atrofiada estaba la mucosa intestinal. Por tanto, para cantidades idénticas de gluten ingerido, el factor más determinante en la concentración de péptidos del gluten excretados en orina era el grado de permeabilidad intestinal incrementado por el aumento creciente del deterioro del epitelio intestinal por la ingesta de gluten (**Figura 2**). La concentración de gluten en orina promedio de los celiacos con grados de atrofia 0 a 2, era de 23,7 ng/ml y su mediana 11,8 ng/ml. La de los que tienen Marsh 3, era de 45.7 ng/ml la media y 29,9 ng/ml la mediana. Aunque la desviación

promedio era alta en ambos casos (21 y 33, respectivamente), la tendencia era significativa indicando más permeabilidad en los que tienen Marsh 3. Dentro de los que tienen Marsh 3, se pudo ver la media y mediana de los que tienen Marsh 3a, Marsh 3b y Marsh 3c. Estos resultados se muestran en la **Tabla 2 y Figura 3**:

Tabla 2: Concentración de GIP en muestras de pacientes con distinto grado de atrofia intestinal tras la ingesta de 3 g de gluten.

	VH:CD		
	0-0,5	0,5-1	>1
Media u-GIP ng/ml	55,9	31,4	8,62
Mediana u-GIP ng/ml	49,8	23,9	9,2

A mayor grado de atrofia, mayor concentración de GIP en orina, siendo especialmente significativas las diferencias con el alto grado de atrofia (Marsh 3b y 3c).

Ejemplo 2. Variabilidad del metabolismo entre personas

Este ejemplo de modo de uso de la invención muestra cómo, en dos individuos distintos, los valores del gluten metabolizado y excretado de distintos días dan valores u-GIP similares. Para ello los individuos 1 y 2 se pusieron 36 horas en dieta sin gluten y al menos 9 horas en ayuno antes de tomarse un sobre de gluten (8 g) que se resuspendió en 250 ml de agua. Antes de la ingesta de gluten, se realizaron una prueba de detección de GIP en orina para confirmar que daban negativo. Tras la ingesta se mantuvieron al menos 8 horas en dieta sin gluten, se recolectaron las orinas durante 9 horas, y posteriormente se midió la concentración de GIP en orina con un test de flujo lateral y el iVYCHECK Reader para cuantificarlo, calculando el volumen de las mismas. En ambos individuos analizados se detectó una desviación estándar de excreción de GIP menor al 20% entre medidas hechas días distintos (**Tabla 3**), con lo que con los valores medios de cada individuo pueden servir como valor interno de referencia previo a un tratamiento que mejore la permeabilidad intestinal de un individuo dado, porque las variaciones en ausencia de patologías son poco significativas.

Tabla 3. Cuantificación de la excreción de péptidos del gluten tras la ingesta en ayunas de 8 g de gluten en suspensión realizada en días distintos en dos voluntarios (µg de gluten excretados en orina durante las 9 horas posteriores a la ingesta).

	Día 1	Día 5	Día 10	Media	Desviación estándar
Individuo 1	16,3	12,0	14,9	14,4	2,2
Individuo 2	26,0	21,9	21,3	23,1	2,5

Las proporciones detectadas de GIP en orina frente a las ingeridas son de 14-23 µg detectados por cada 8 g de gluten ingerido. Unos 8 g de gluten ingerido usando métodos de inmunoensayos específicos anti-33-mer, equivalen a alrededor de 1-1,33 g de GIP usando iVYCHECK urine (Biomedal, España). La cantidad excretada supone por tanto solo un 0,001-0,002% de la cantidad ingerida, por eso se necesita una técnica específica y muy sensible para detectar esos péptidos en orina.

Ejemplo 3. Cantidad de péptidos del gluten excretados en distintos individuos comparado con su excreción de lactulosa/manitol.

En este ejemplo se puede contemplar como la excreción de la casi totalidad del gluten detectable en orina puede ocurrir en pocas horas tras la ingesta en ayunas de una cantidad de gluten en polvo fija, y cómo correlaciona mejor con la excreción de lactulosa que con una molécula más pequeña como el manitol, indicando que estamos estimando la permeabilidad paracelular (lactulosa) frente a la intracelular (manitol). Además, se puede observar cómo la excreción de la mayor parte del gluten detectable ocurre en las primeras 9 a 15 horas, disminuyendo el grado de variabilidad intraindividuo con respecto a la lactulosa.

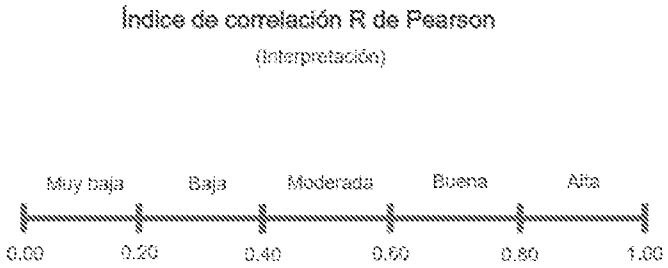
Particularmente, los sujetos (n =15) recibieron 8 g de gluten, después de un ayuno de al menos 8 horas, y tras una dieta sin gluten de al menos 36 horas en individuos sin enfermedad celiaca diagnosticada. El gluten consistía en un granulado con saborizantes (edulcorantes y colorantes alimentarios) en polvo que estaba contenido en sobres de sellado térmico de un solo uso. A la vez los voluntarios tomaron 1 g de manitol y lactulosa 10 g. Posteriormente, se recolectaron las distintas orinas en botes independientes, para poder realizar medidas individualizadas de la concentración en cada micción, así como el volumen total de las orinas. Se determinó, a través del producto iVYCHECK urine y un lector calibrado de tiras de flujo lateral iVYCHECK Reader (Biomedal, España) la cantidad de péptidos del gluten presentes en orina excretada durante 15 horas posteriores a la ingesta de gluten. El gluten ingerido se mezcló con 1 g de manitol y 10 g de lactulosa para usarlos de control. El manitol

permite estimar la permeabilidad intracelular, y la lactulosa la permeabilidad paracelular, estudiando los valores de referencias ya descritos ampliamente en la literatura biomédica.

La cantidad de péptidos de gluten se correlacionó directamente con la permeabilidad intestinal. Aunque factores como la velocidad de digestión de gluten pueden influir, se entiende que dentro del mismo individuo los valores de referencia pueden ser constantes, como se vio en el ejemplo anterior. Dada la variabilidad del metabolismo del gluten y su cinética de excreción se recomendó la ingesta una vez que el sujeto hubiera miccionado con el objetivo de vaciar en lo posible la vejiga (a primera hora de la mañana), manteniendo preferentemente un ayuno de al menos 8 horas para la metabolización acelerada del gluten ingerido hasta su excreción sin afectarse por otros alimentos ingeridos simultáneamente. Los valores obtenidos se pudieron comparar con valores de referencia obtenidos de la realización del mismo procedimiento con individuos sin enteropatías asociadas a la permeabilidad intestinal, o bien se pudieron usar como referencias en sí mismos para determinaciones posteriores que indiquen evolución hacia un mayor valor de excreción de péptidos del gluten (mayor permeabilidad) o menor excreción de péptidos del gluten (menor permeabilidad).

En este ejemplo realizado con 15 voluntarios sin síntomas de enfermedad digestiva diagnosticada, se analiza la orina basal. Se recopilaron todas las orinas en frascos separados durante 15 horas tras la ingesta del sobre con gluten. Se mezclaron las orinas excretadas: entre las 0-6 h tras ingesta. Después entre las 2-15 h tras ingesta. Se midieron las concentraciones de GIP en las orinas excretadas, tanto por ELISA como LFIA entre las 0-6 h tras ingesta y entre las 2-15 h tras ingesta de forma individual. Se midió la concentración de GIP de cada orina de cada voluntario (**Figura 4**) y de lactulosa (**Figura 5**) y, posteriormente, se calcula el % excretado respecto a lo ingerido en GIP y la ratio lactulosa/manitol (**Figura 6**). Se determinó la correlación entre lactulosa:manitol y GIP. La dinámica de excreción de la lactulosa es diferente en cada individuo, llegándose a excretar más allá de las 15 h. Se sabe que los azúcares pueden ser reabsorbidos por el cuerpo. Por eso la lactulosa puede tener varios picos de excreción. Se estima que la lactulosa y los GIP pasen ambos por la misma vía, la paracelular. Debido a ello se comparan las mezclas de 2-15 h de GIP frente a las de 0-6 h y 2-15 h de lactulosa.

La interpretación del coeficiente de correlación es la siguiente:



También se realizan los análisis para detectar los *outliers* de cada grupo, y poder eliminarlos de las correlaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto que comprende:
    a. Administrar vía oral al sujeto entre 0,5 y 40 g de gluten, o una fuente del mismo, después de un ayuno de al menos 8 horas, y tras una dieta sin gluten de al menos 16 horas,
    b. Determinar la cantidad de péptidos del gluten presente en orina excretada durante al menos las siguientes 6 horas a partir de la administración realizada en la etapa a),

    donde la presencia de una cantidad de gluten determinada en el paso b) significativamente superior a los valores de referencia preestablecidos, es indicativo de hiper-permeabilidad intestinal.

2. Método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades que cursan con hiper-permeabilidad intestinal seleccionadas del grupo que comprende: síndrome de intestino permeable, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, colitis microscópica dispepsia funcional, atrofia vellositaria crónica/aguda por tratamientos crónicos con algunos fármacos y/o hipersensibilidad alimentaria no mediada por IgE, que comprende determinar la permeabilidad intestinal en un sujeto siguiendo el método de la reivindicación 1.

3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la fuente de gluten se proporciona en una suspensión acuosa con al menos 2 g de gluten.

4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la determinación de la cantidad de los péptidos del gluten se lleva a cabo de forma directa a través de un inmunoensayo para la detección de los propios péptidos del gluten, o de forma indirecta mediante la detección de autoanticuerpos frente a los péptidos del gluten.

5. Método *in vitro*, según la reivindicación 4, donde el inmunoensayo comprende anticuerpos frente a péptidos del gluten que comprenden las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y/o sus derivados.

6. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado porque la determinación de la cantidad de los péptidos del gluten se lleva a cabo a través de un inmunoensayo seleccionado entre: ELISA, LFIA, CLIA o biosensores.

7. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque los péptidos del gluten se concentran mediante sistemas de extracción de uno de los tipos siguientes: LFIA, ELISA, CLIA, SIMOA, Luminex, turbidometría o inmunocromatofragía.

8. Kit de partes para realización del método de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:
    a. Formulación con 0,5 a 40 g de gluten.
    b. Envase recolector de orina.
    c. Test inmunológico que comprenda anticuerpos que puedan formar complejos con los péptidos inmunogénicos del gluten y detectarse por métodos turbidimétricos, visuales, colorimétricos, fluorimétricos, quimioluminiscentes, y/o detección térmica.

9. Kit de partes, según la reivindicación 8, donde el test inmunológico consiste en una tira reactiva de flujo lateral con anticuerpos frente a péptidos inmunogénicos del gluten.

10. Kit de partes, según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde el test inmunológico consiste en un ensayo ELISA, LFIA, CLIA o por micropartículas magnéticas o fluorescentes o fosforescente.

11. Péptido de gluten caracterizado porque comprende o consiste en las secuencias: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID

NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y/o sus derivados; o anticuerpos reactivos frente a dichos péptidos o sus derivados, para ser usados en un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto.

12. Péptido o anticuerpo para ser usado, según la reivindicación 11, en un método *in vitro* para evaluar el estado de la permeabilidad intestinal de un sujeto que comprende: a) administrar vía oral al sujeto entre 0,5 y 40 g de gluten, o una fuente del mismo, después de un ayuno de al menos 8 horas, y tras una dieta sin gluten de al menos 16 horas, y b) determinar la cantidad de péptidos del gluten presente en orina excretada durante al menos las siguientes 6 horas a partir de la ingesta de gluten, donde la presencia de una cantidad de gluten determinada en el paso b) significativamente superior a los valores de referencia preestablecidos, es indicativo de hiper-permeabilidad intestinal.

Figura 1

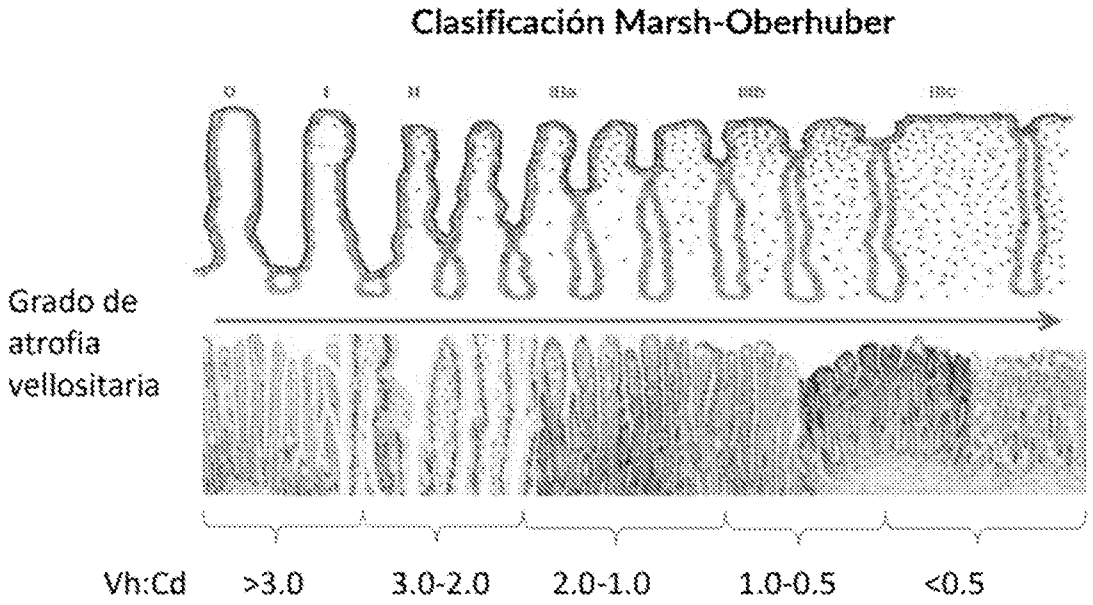


Figura 2

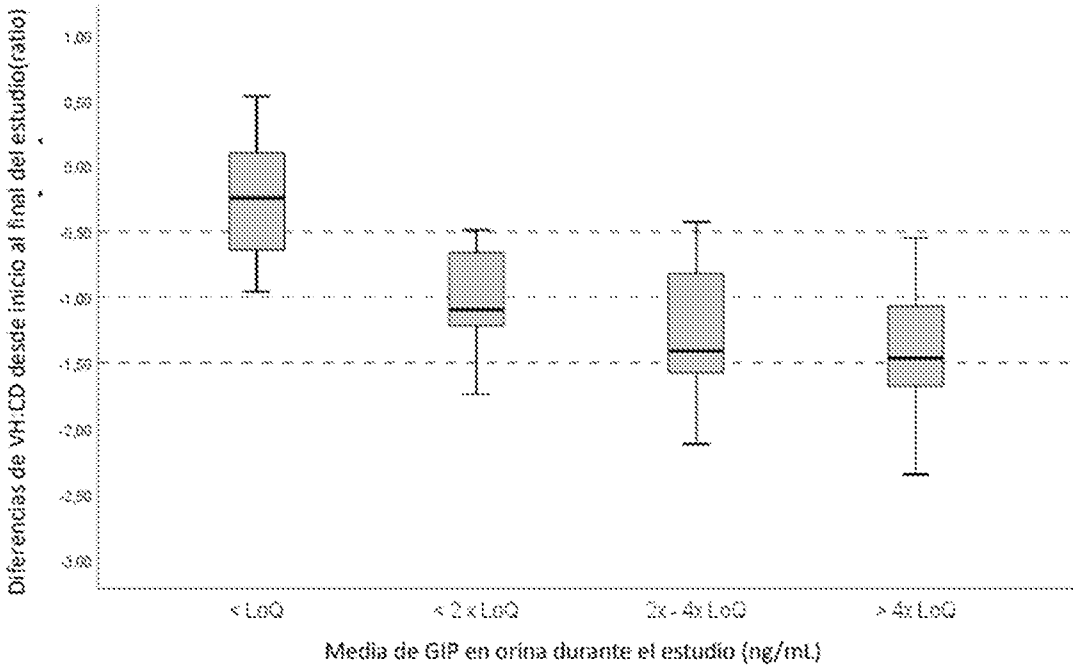


Figura 3

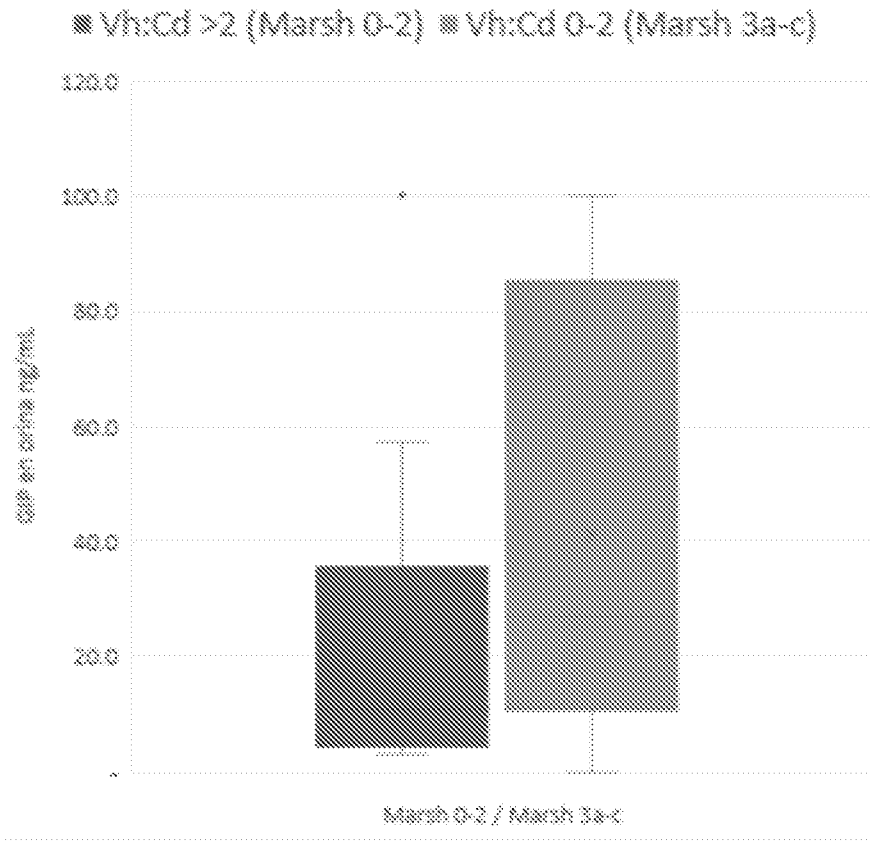


Figura 4

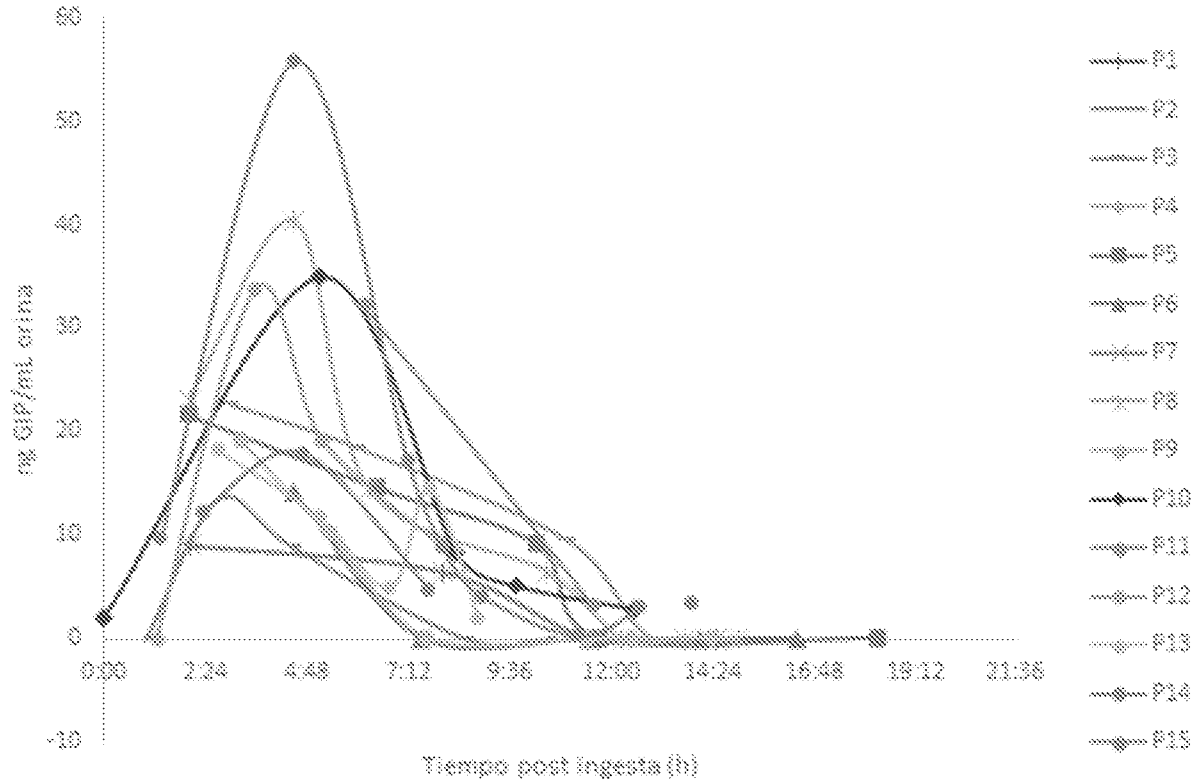


Figura 5

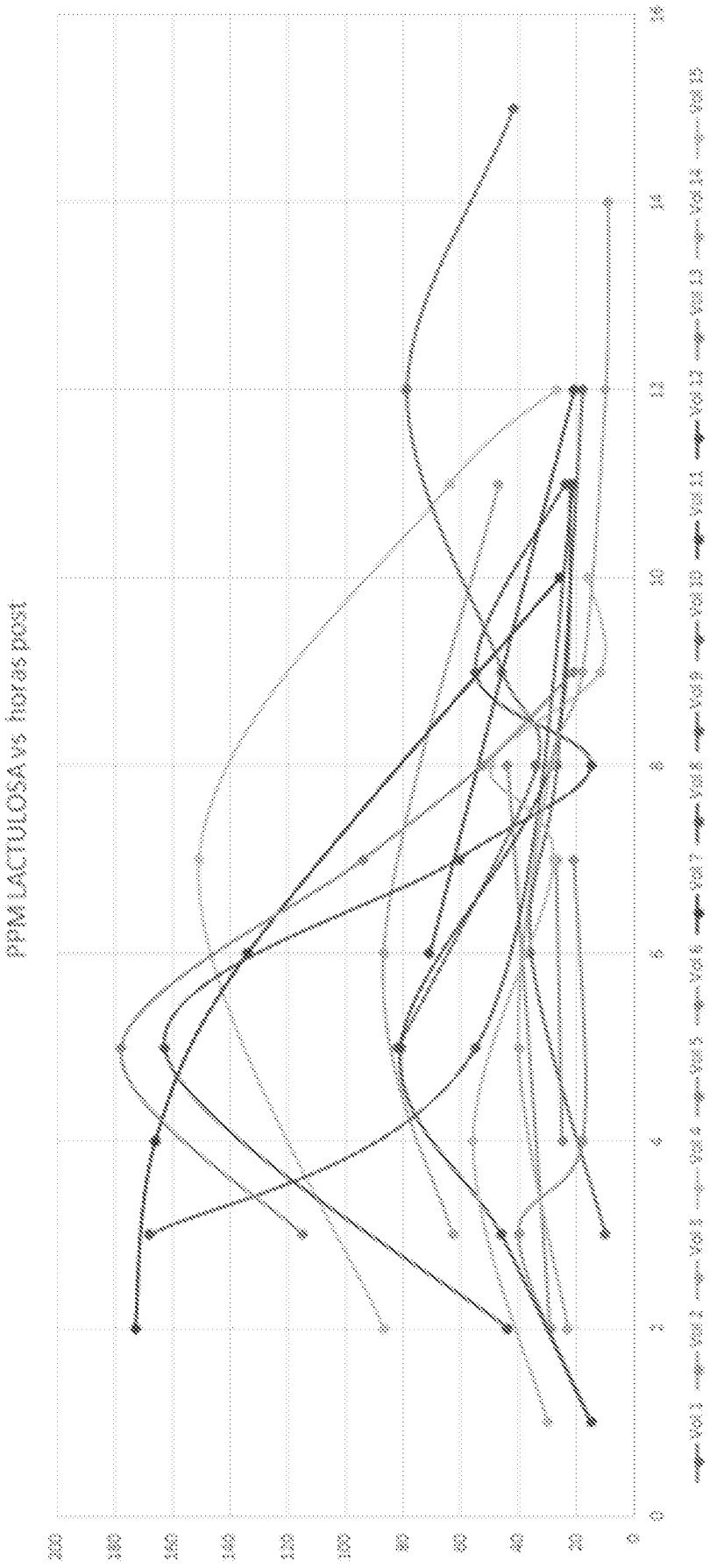
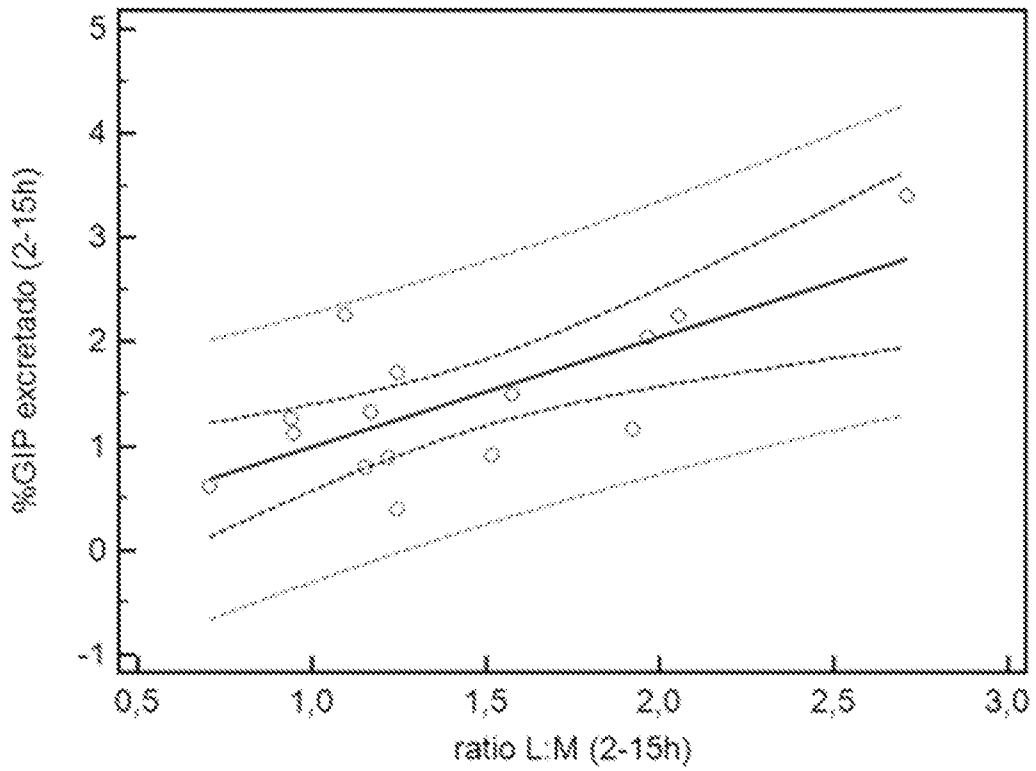

PPM LACTULOSA vs horas post
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Vol 1
Vol 2
Vol 3
Vol 4
Vol 5
Vol 6
Vol 7
Vol 8
Vol 9
Vol 10
Vol 11
Vol 12
Vol 13
Vol 14
Vol 15

Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202330222

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2023

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LOMBARDO, VINCENZA et al. "Evaluation of a single determination of gluten immunogenic peptides in urine from unaware celiac patients to monitor gluten-free diet adherence". Nutrients. Marzo 2023, Vol. 15, Nº 5, artículo nº 1259. ISSN 2072-6643 (Electronic), <DOI: doi:10.3390/nu15051259>. todo el documento.	8-10, 12
A	RUIZ-CARNICER, ANGELA et al. "Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: new proposals for follow-up in celiac disease." The American Journal of Clinical Nutrition. Noviembre 2020, Vol. 112, Nº 5, páginas 1240 – 1251. ISSN 1938-3207 (Electronic), <DOI: doi:10.1093/ajcn/nqaa188>. todo el documento.	8-10, 12
A	MORENO, MARIA DE LOURDES et al. "Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing." Gut. Febrero 2017, Vol. 66, Nº 2, páginas 250 - 257, ISSN 1468-3288 (Electronic), <DOI: doi:10.1136/gutjnl-2015-310148>. todo el documento.	8-10, 12
A	WO 2012089868 A2 (UNIVERSIDADD DE SEVILLA et al.) 05/07/2012, todo el documento.	8-10, 12
A	WO 2013098441 A1 (UNIV SEVILLA) 04/07/2013, todo el documento.	8-10, 12
A	WO 2013045737 A1 (UNIV VALLADOLID) 04/04/2013, todo el documento.	8-10, 12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 8-10, 12

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.01.2024	M. Hernández Cuéllar	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/53 (2006.01)
G01N33/564 (2006.01)
C07K14/415 (2006.01)

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

G01N, C07K

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

EPODOC, WPI, INVENES, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY, CAPLUS