



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 043**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02718225 .2**
96 Fecha de presentación : **24.04.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1390753**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Procedimiento y medio para detectar enfermedades inducidas por el gluten.**

30 Prioridad: **25.04.2001 FI 20010868**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Maki HealthTech Oy**
Lapinkaari 21 A 33
33180 Tampere, FI
Ilma Korponay-Szabo

72 Inventor/es: **Mäki, Markku y**
Korponay-Szabo, Ilma

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 314 043 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 y medio para detectar enfermedades inducidas por el gluten.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la diagnosis, rastreo y seguimiento de enfermedades relacionadas con la intolerancia al gluten tal como la enfermedad celíaca y otras entidades de enfermedades sensibles al gluten. De manera más precisa, la invención se refiere a un procedimiento de detección de enfermedades inducidas por el gluten en una muestra de sangre de un sujeto. La invención se refiere además al uso de un autoantígeno en un procedimiento de detección y al uso de un kit de ensayo en el procedimiento.

Antecedentes de la invención

La enteropatía sensible al gluten es una intolerancia determinada genéticamente al gluten de la dieta, las nocivas prolaminas del trigo, centeno y cebada. Los alelos de HLA DQA1*0501 y DQB1*0201 que codifican el heterodímero HLA DQ2 confieren la susceptibilidad genética tanto a la enfermedad celíaca (también escrita como coeliaca) como a la dermatitis herpetiforme, las formas de enfermedad más comúnmente diagnosticadas que pertenecen a este grupo. Uno o más de los hasta ahora genes desconocidos en los loci no ligados a HLA predisponen también lo más probablemente a la enfermedad celíaca, en donde la ingestión de gluten conduce a la atrofia vellosa en el intestino delgado. La enteropatía es el resultado de procesos autoinmunes iniciados por el gluten y se auto-perpetúa en la presencia de consumo de gluten. La respuesta inmunológica se reduce y se observa una curación mucosal cuando se excluye el gluten de la dieta. La manifestación clínica típica de la enfermedad celíaca es una evidente malabsorción en niños o una enfermedad de agotamiento severo en adultos. Durante las pasadas décadas se ha hecho evidente que la enfermedad celíaca está infradiagnosticada las características clínicas de la enfermedad han cambiado hacia formas más suaves, y la diagnosis se hace frecuentemente a edad más avanzada. Igualmente, en los pacientes adultos existe un desplazamiento hacia síntomas más suaves. La verdadera prevalencia de la enfermedad celíaca en diferentes poblaciones puede ser tan alta como de uno entre 100.

El haplotipo DR3-DQ2 es típico para muchos trastornos autoinmunes y se encuentra aproximadamente en el 25% de la población europea. Las asociaciones de enfermedades celíacas comunes son la diabetes mellitus dependiente de la insulina, síndrome de Sjögren, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y vitíligo. Además, la prevalencia de trastornos autoinmunes en la enfermedad celíaca está relacionada con la duración de la exposición al gluten. Igualmente, los pacientes con enfermedad celíaca no tratados corren un riesgo incrementado de enfermedades malignas y linfoma del intestino delgado. Las manifestaciones iniciadas por gluten extraintestinales son la dermatitis herpetiforme, defectos permanentes del esmalte de los dientes, osteopenia, complicación hepática, cardiomiopatía, infertilidad, ataxia, y epilepsia con calcificaciones cerebrales.

La biopsia del intestino delgado es la piedra angular para la diagnosis de la enfermedad celiaca. Además de la atrofia vellosa subtotal y la hiperplasia de la cripta, una característica típica para la lesión mucosal del intestino inducida por el gluten, es una alta densidad de linfocitos T $\gamma\delta$ + intraepiteliales. Sin embargo, la biopsia es una herramienta de diagnóstico invasiva y es inadecuada para fines de rastreo. Ciertos anticuerpos del suero, es decir, anticuerpos endomisiales y de reticulina, son inducidos por el gluten, dirigidos contra la matriz extracelular del tejido del propio paciente, y son altamente específicos de la enfermedad celiaca. Típicamente, estos anticuerpos se encuentran en la clase IgA, pero los pacientes celíacos con deficiencia IgA selectiva producen anticuerpos similares en la clase IgG (Collin, P. y otros, *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 27, págs. 367-71, (1992)). Recientemente, la enzima transglutaminasa celular o de tipo tisular (tTG, EC 2.3.2.13, en adelante denominada como transglutaminasa) ha sido identificada como el autoantígeno diana tanto para autoanticuerpos endomisiales como de reticulina. El ensayo serológico basado en la detección de estos anticuerpos puede usarse para identificar pacientes con síntomas suaves o atípicos y entre sujetos que sufren de enfermedades asociadas, e incluso en la población. Los casos encontrados mediante rastreo han llegado a ser la clave en la diagnosis de la enteropatía por gluten en los últimos años y algunos países han iniciado incluso el rastreo en masa de la población en edad escolar. Existe una evidencia acumulativa, de que el espectro de enfermedades sensibles al gluten es más amplio que la enteropatía por gluten clásica y puede representar una salida al cuidado de la salud general.

El rendimiento fiable y reproducible de estos ensayos de anticuerpos se ha logrado únicamente en laboratorios especializados con los procedimientos actuales. Los ensayos de anticuerpo endomisial y de reticulina requieren substratos de tejidos congelados, equipos inmunofluorescentes y personal altamente entrenado para evaluar visualmente los resultados de unión del anticuerpo. De manera importante, los ensayos ELISA basados en transglutaminasa proporcionan al observador resultados no dependientes y cuantitativos. Sin embargo, su componente crucial es el antígeno transglutaminasa el cual debería ser preferiblemente tan similar al autoantígeno humano natural como fuera posible. La conformación activa catalíticamente inducida por Ca^{2+} parece ser el antígeno preferido reconocido por la mayoría de los autoanticuerpos del paciente, pero la especificidad del epítipo de pacientes individuales puede diferir. Es difícil de mantener el plegado correcto de la enzima durante la purificación a partir de tejidos animales o lograrlo cuando se producen proteínas transglutaminasa recombinantes. Además, la transglutaminasa es muy sensible al almacenamiento incluso a -40°C y, por ello, la continua necesidad de lotes de antígeno apropiados y recientes puede hacer que el ensayo de anticuerpo transglutaminasa sea muy costoso. Brenner y otros, en *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 522, págs. 74-83, (1978), han aislado y caracterizado transglutaminasa a partir de eritrocitos humanos. Laszlo Lorand y otros,

en *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 73, págs. 4479-4481, (1976), han estudiado la actividad transglutaminasa de eritrocitos humanos hemolizados mediante congelación y descongelación, y han encontrado que su actividad dependió de la concentración de Ca^{2+} . Comercialmente, solo se encuentra disponible transglutaminasa tisular purificada procedente de hígado de cobaya (Sigma), pero se ha encontrado que esta transglutaminasa de roedor era menos sensible en la detección de anticuerpos celíacos que la enzima humana natural preparada a partir de glóbulos rojos humanos (Hansson y otros, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 30, págs. 379-84, (2000)).

Existe una necesidad de un ensayo de rastreo serológico simple para la enfermedad celiaca y entidades de enfermedades sensibles al gluten relacionadas. Un ensayo de este tipo se llevaría a cabo preferiblemente cuando surgiera la primera sospecha de la afección celiaca u otras entidades de enfermedades sensibles al gluten, es decir, tanto en el caso primario o como un rastreo en masa. Debería igualmente ser aplicable al seguimiento de pacientes previamente diagnosticados. La presente invención proporciona ahora un procedimiento rápido, barato y exacto de diagnóstico de enfermedades inducidas por el gluten.

Sumario de la invención

De manera sorprendente, se ha encontrado ahora que el antígeno transglutaminasa tisular tTG humana intacta se encuentra en muestras de sangre entera dentro de los glóbulos rojos (RBC) en una cantidad suficiente para servir como antígeno en un ensayo para autoanticuerpos contra tTG. De acuerdo con ello, no existe necesidad de agregar transglutaminasa externa para la medición de autoanticuerpos transglutaminasa circulantes. El antígeno solamente tiene que ser liberado de los RBCs mediante hemólisis, lo cual permite que la transglutaminasa y los anticuerpos transglutaminasa específicos reaccionen en la fase líquida de la propia muestra para formar complejos autoantígeno-autoanticuerpo. Otra ventaja lograda mediante el uso de autoantígenos en el ensayo es que el ensayo es insensible a variaciones individuales en los antígenos tTG entre personas diferentes.

El procedimiento de detección de enfermedades inducidas por el gluten de acuerdo con la presente invención, se caracteriza porque una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos (RBC) se hemoliza para liberar transglutaminasa tisular (tTG) a partir de RBCs en la muestra, la tTG liberada se deja reaccionar con posibles autoanticuerpos anti-tTG en la muestra para formar un complejo antígeno-anticuerpo, y dicho complejo se ensaya, con lo cual, la presencia de dicho complejo indica una enfermedad inducida por el gluten. El procedimiento de la presente invención puede igualmente caracterizarse porque una muestra de sangre hemolizada de dicho sujeto se hace reaccionar con una proteína de captura de tTG, después de lo cual, se ensaya cualquier complejo antígeno-anticuerpo capturado, con lo cual, la presencia de dicho complejo indica una enfermedad inducida por el gluten.

La invención incluye además el uso de transglutaminasa tisular (tTG) liberada a partir de glóbulos rojos (RBCs) de una muestra de sangre en un ensayo para la detección de autoanticuerpos anti-tTG en dicha muestra, con lo cual, la presencia de dichos autoanticuerpos indica una enfermedad inducida por el gluten.

Otro objeto aún de la invención es el uso de un kit de ensayo en el procedimiento descrito. El kit de ensayo se caracteriza porque comprende medios para el ensayo de un complejo antígeno-anticuerpo formado entre transglutaminasa tisular (tTG) liberada y autoanticuerpos anti-tTG en una muestra de sangre.

Las realizaciones ventajosas de la presente invención se establecen en las reivindicaciones pertinentes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra IgA de paciente específica de transglutaminasa medida mediante el ensayo de sangre entera usando muestras de sangre hemolizada y anticuerpos de captura anti-tTG de clase IgG inmovilizados sobre placa ELISA. La IgA unida se midió con anti-IgA conjugada con peroxidasa. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (AU), como porcentaje de densidad óptica medida con una muestra de referencia positiva y dibujada gráficamente para pacientes con enfermedad celíaca (CD) no tratada, tratada o latente, así como para los controles.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos con las muestras de sangre entera de pacientes celíacos (CD) y controles usando anticuerpos de captura de anti-fibronectina de conejo. Los resultados se muestran como densidades ópticas.

La Figura 3 muestra las cantidades de transglutaminasa capturada en la placa ELISA a partir de muestras de ensayo de sangre entera por anticuerpos IgG anti-tTG celíacos. La transglutaminasa se midió con anticuerpos CUB 7402 monoclonales. Los resultados se muestran como densidades ópticas.

La Figura 4 muestra el ensayo del sistema de captura para la especificidad para transglutaminasa. Se aplicaron anticuerpos de captura irrelevantes y específicos de transglutaminasa (IgG de ratón monoclonal o IgG humano) y se realizó una incubación tipo sándwich con antígeno transglutaminasa de glóbulo rojo normal y muestras de suero de pacientes (15 pacientes con dermatitis herpetiforme y 15 controles). La tabla indica los componentes que fueron incluidos en los diferentes grupos de captura y las barras muestran los valores de densidad óptica obtenidos en cada grupo.

La Figura 5 muestra la correlación de valores de densidad óptica obtenidos con el uso de muestras de sangre entera (plasma citrado + RBC propio citrado reconstituido) y la aplicación tipo sándwich del antígeno transglutaminasa de glóbulo rojo seguido de la incubación con muestras de plasma de pacientes. En un grupo, se reconstituyó el plasma y el lisato de glóbulos rojos de los pacientes y se agregaron conjuntamente a los anticuerpos de captura de anti-tTG de celíacos. En los otros grupos, se agregó el lisato de glóbulo rojo normal o el lisato de glóbulo rojo propio de los pacientes a placas recubiertas con el mismo tipo de anticuerpos de captura. Para fines de control, se agregaron igualmente muestras de plasma sin glóbulos rojos. Los resultados se muestran como densidades ópticas.

La Figura 6 muestra los resultados del ensayo capilar con heparina (1-2), laminina (3-4), colágeno (5-6) y gelatina (7-8), como compuestos de captura, y las densidades ópticas obtenidas con las muestras de sangre entera hemolizada procedente de pacientes celíacos (n=10, columnas 1,3,5,7) y de controles (n=12, columnas 2,4,6,8) cuando la heparina (1-2), laminina (3-4), colágeno (5-6) o gelatina (7-8) se inmovilizaron a las placas ELISA y usaron como compuestos de captura. La IgA unida se midió con anti-IgA conjugada con peroxidasa. Los mismos símbolos representan las mismas muestras en los diferentes ensayos.

Descripción detallada de la invención

Por “enfermedad inducida por el gluten” tal como se usa aquí, se refiere a cualquier entidad o trastorno de enfermedad inducida por el gluten, que está asociada a autoanticuerpos contra transglutaminasa tisular tTG. Las enfermedades inducidas por el gluten causan frecuentemente enteropatía y las enfermedades inducidas por el gluten las mejor conocidas son la enfermedad celiaca y la dermatitis herpetiforme. Sin embargo, hoy en día conocemos que existen igualmente enfermedades inducidas por el gluten sin síntomas de enteropatía. Por ello, un mejor indicador de enfermedad inducida por el gluten es la incidencia de autoanticuerpos tTG.

La “proteína de captura de tTG” tal como se menciona aquí, significa cualquier proteína capaz de unirse al complejo tTG-anti-tTG, o a un complejo asociado a dicho complejo, tal como fibronectina. Preferiblemente, la proteína de captura de tTG es un anticuerpo contra tTG, o fibronectina, el cual es sabido que se une a tTG. Puede ser incluso un anticuerpo fibronectina, el cual es capaz de capturar el complejo tTG-anti-tTG, dado que dicho complejo se une también a la fibronectina presente en la muestra. De acuerdo con ello, el anticuerpo fibronectina une la fibronectina del complejo formado fibronectina-tTG-anti-tTG. Dicho complejo puede igualmente ser capturado por gelatina. Se han obtenido buenos resultados usando IgG anti-tTG humano obtenido a partir de pacientes deficientes en IgA como proteína de captura de tTG. Preferiblemente, se usa una mezcla de al menos dos de dichos anticuerpos IgG con diferente especificidad epítipo.

Los “medios para ensayo” del complejo antígeno-anticuerpo incluyen cualquier reactivo necesario para indicar el complejo formado. Dichos medios pueden consistir esencialmente de medios para la captura del complejo y medios para la detección del complejo capturado. Los medios para la detección del complejo son, preferiblemente, reactivos necesarios para un ensayo inmunoenzimático (ELISA). En una realización de la invención, los medios de captura comprenden anticuerpos anti-tTG unidos a un soporte sólido y los medios de detección comprenden anti-IgA marcado y reactivos necesarios para la detección del marcador.

Se extrae una muestra de sangre procedente de un sujeto sospechoso de ser intolerante al gluten. La muestra de sangre a ensayar debería contener glóbulos rojos, los cuales son hemolizados. La hemólisis puede llevarse a cabo de cualquier modo convencional que rompa los glóbulos rojos de manera tal que se libere la tTG. Es posible la congelación y descongelación y el uso de una solución hipotónica, por ejemplo, el agua es otra.

La invención proporciona un ensayo de unión de anticuerpo mejorado para la diagnosis, diagnosis diferencial, rastreo y seguimiento de intolerancia al gluten genética, incluyendo la enfermedad celiaca, dermatitis herpetiforme, sujetos sensibles al gluten en enfermedades asociadas y el rasgo celíaco caracterizado por la producción de anticuerpos contra transglutaminasa. En muestras de pacientes de sangre entera se encuentra antígeno transglutaminasa humano intacto dentro de los glóbulos rojos (RBC) y no existe necesidad de agregar transglutaminasa externa para la medición de los autoanticuerpos transglutaminasa circulantes. El antígeno solamente ha de ser liberado de los RBCs mediante hemólisis, lo cual permite que la transglutaminasa y los anticuerpos transglutaminasa específicos reaccionen en la fase líquida de la propia muestra. A continuación, los complejos antígeno-anticuerpo son capturados en una superficie sólida mediante anticuerpos de captura adecuados, proteínas (por ejemplo, fibronectina) o productos químicos que identifican el antígeno transglutaminasa tisular. Después de separación por lavado de los componentes no unidos, pueden medirse las parejas de unión con procedimientos inmunoquímicos.

En otra realización de la invención, se mide en base al mismo principio el contenido en transglutaminasa de los glóbulos rojos del paciente o uno de otros compuestos asociados a la transglutaminasa, tal como, por ejemplo, fibronectina.

El ensayo de unión de proteína es, preferiblemente, un inmunoensayo seleccionado entre radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoenzimático (ELISA), fluoroinmunoensayo (FIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA), ensayo inmunoenzimométrico (IEMA), ensayo de inmunoluminiscencia y ensayo de inmunofluorescencia (Madersbacher, S., Berger, P., *Antibodies and Immunoassays. Methods*, vol. 21, págs. 41-50, (2000)).

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede aplicarse también a sistemas de detección de color simple (por ejemplo, Nunc-Immuno Stick), que pueden llevarse a cabo junto a la cama del paciente o en el despacho del médico. Solamente requiere 10-50 microlitros de sangre entera, por lo cual, puede realizarse también a partir de la sangre capilar por un pinchazo en el dedo y no es necesario obtener sangre venosa o suero.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Pacientes

Las muestras de pacientes se recogieron en el Heim Pal Children's Hospital, Budapest, procedentes de pacientes que esperaban biopsia yeyunal por sospechas de enfermedad celíaca (CD) o dermatitis herpetiforme (DH), así como procedentes de pacientes tratados diagnosticados previamente con estas enfermedades. La CD se diagnosticó de acuerdo con los criterios actuales de la European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, que comprenden la demostración de atrofia vellosa yeyunal en histología y una mejora clínica clara sobre una dieta libre de gluten, así como la exclusión de otras enteropatías. La DH se diagnosticó con estudio inmunofluorescente directo de biopsia de la piel mediante la presencia de depósitos de IgA granular en las papilas dérmicas de la piel no implicada adyacente a las lesiones de piel visibles. En el primer experimento, se ensayaron muestras procedentes de 84 pacientes sensibles al gluten (51 no tratados, incluyendo 5 de DH no tratados; 6 latentes, 27 con una dieta libre de gluten) con una edad media de 4,7 años (intervalo: 1-31), y procedente de 10 controles de enfermedad no celíaca con estructura vellosa yeyunal normal. Con fines de control, se usaron muestras del hospital aleatorias sometidas a ensayo de gasometría sanguínea (n=38). La edad de los controles fue de 0,4-13 años.

Se realizaron otros experimentos con muestras de 15 pacientes adicionales con CD, 15 con DH y 42 controles.

Manipulación de la muestra

Las muestras de sangre entera se recogieron dentro de tubos capilares heparinizados (Clinitubes Radiometer NS, Copenhagen, Dinamarca), se mezclaron con un agitador de varilla magnética y se sellaron con tapas por ambos lados. A continuación, las muestras se hemolizaron mediante congelación y se almacenaron hasta el ensayo a -20°C o menos. Para el ensayo inicial, tanto la sangre venosa como la sangre capilar obtenida mediante pinchazo en el dedo se usó para llenar los tubos capilares. Los ensayos de control se llevaron a cabo con sangre venosa recogida dentro de tubos (Vacutainer, Becton Dickinson, Meylan, Francia) con EDTA o citrato sódico. Estos se congelaron, igualmente, conforme fueron recogidos o el plasma y los glóbulos rojos se congelaron por separado después de centrifugación durante 5 minutos con 4000 rpm.

Captura de anticuerpo celiaco y ensayo mediante ELISA

En el momento del ensayo, las muestras de sangre entera congeladas se descongelaron, se mezclaron nuevamente, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se diluyeron con solución salina 0,15 M tamponada con Tris 0,05 M con EDTA 10 mM y Tween 20 al 0,1%, pH 7,4 (TTBS). Los experimentos se llevaron a cabo con otras soluciones para dilución, incluyendo agua destilada, solución salina tamponada con Tris con CaCl_2 2,5 ó 5 mM y soluciones conteniendo albúmina o suero normal de las especies (conejo) en las cuales se produjeron los anticuerpos secundarios.

Las placas de microvaloración (Nunc Immuno-Plate Maxisorp, Nunc A/S Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con una mezcla de dos anticuerpos celiacos clase IgG con diferente especificidad epítipo obtenidos a partir de pacientes celíacos deficientes en IgA con enfermedad activa y anticuerpos endomisial y transglutaminasa clase IgG altamente positiva. Las diluciones respectivas de las muestras de suero de captura celiaca fueron 1:1000 y 1:2000 en tampón de bicarbonato 0,03 M, pH 9,6, y se usaron para recubrir la placa durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron tres veces en TTBS. Después del bloqueo de las placas con suero bovino no se usó albúmina. Las placas se incubaron durante una hora con las muestras de sangre entera diluida a temperatura ambiente. Después de extensos lavados en TTBS, se midieron los anticuerpos de pacientes de clase IgA unidos con anticuerpos de conejo marcados con peroxidasa contra IgA humana (DAKO NS, Glostrup, Dinamarca) diluida 1:2000 en TTBS. El color se reveló con 1 mg/ml de dihidrocloruro de ofenilenodiamina (DAKO) con H_2O_2 al 0,06% en citrato sódico 0,1 M, pH 4,2 y se leyó espectrofotométricamente a 450 nm.

En algunos experimentos, la reacción ELISA se interrumpió con H_2SO_4 2,5 M y la absorbancia se midió igualmente a 492 nm. Las muestras se ensayaron en dos muestras duplicadas. Se incluyeron una muestra positiva conocida y los blancos en cada ensayo. La concentración de anticuerpo se obtuvo tanto como densidades ópticas como en unidades arbitrarias calculadas como el porcentaje de la muestra de referencia positiva.

En otros experimentos, se ensayaron igualmente otros anticuerpos de captura, incluyendo anticuerpos de cabra policlonales contra transglutaminasa tisular (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) y diferentes anticuerpos de ratón monoclonales contra transglutaminasa tisular (CUB7402 y TG100 de Neomarkers, Fremont, CA) así como otros anticuerpos de pacientes de clase IgG. Para la inmovilización de los anticuerpos monoclonales, se recubrió

primeramente la placa con un anticuerpo de conejo policlonal contra IgG1 de ratón (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) diluido 1:500 en tampón de bicarbonato y los monoclonales se agregaron en TTBS.

La transglutaminasa tiene un sitio de unión a fibronectina en su parte N-terminal y podría incluso purificarse a partir de RBCs mediante el uso de fibronectina (Radek y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, págs. 3152-6, (1993)). De acuerdo con ello, se ensayaron igualmente para determinar la captura placas ELISA recubiertas con fibronectina humana (F 2006 de Sigma, diluida 1:1000 en tampón de bicarbonato, pH 9,6). Puesto que el plasma humano contiene ya algo de fibronectina, se usaron igualmente como anticuerpos de captura anticuerpos de conejo contra fibronectina humana (de DAKO, diluida 1: 2000 en tampón de bicarbonato, pH 9,6). El uso de anticuerpos de captura distintos de la IgG humana se introdujo para hacer posible el ensayo de anticuerpos transglutaminasa de clase IgG con el mismo principio usando anticuerpos secundarios contra IgG humana en lugar de IgA humana.

Ensayo para determinar la presencia y cantidad de transglutaminasa capturada en las placas ELISA

La cantidad de transglutaminasa de glóbulos rojos unida a la placa se comprobó en pocillos separados recubiertos con los anticuerpos de captura y se incubaron con las diluciones de sangre entera hemolizada. La transglutaminasa unida se midió con CUB7402, anticuerpos monoclonales o policlonales TG-100 contra transglutaminasa tisular seguido de anticuerpos de conejo conjugados con peroxidasa contra inmunoglobulinas de ratón (DAKO). El color se reveló de manera similar a la detección de IgA unida.

Ensayo para determinar la especificidad de la captura del antígeno/anticuerpo

Los ensayos de control para el ensayo de células de sangre entera se llevó a cabo con muestras de plasma o suero (diluidas a concentraciones finales similares) procedentes de los mismos pacientes con o sin la adición de lisato de glóbulos rojos normales diluidos 1:20.

Para el ensayo adicional de la especificidad de la captura, se usó un lisato de glóbulo rojo bruto procedente de glóbulos rojos normales de donantes de sangre diluido 1:20-1:40 como el antígeno y las muestras de suero de pacientes se agregaron en una vía ELISA tipo sándwich, después de separación por lavado del lisato de glóbulo rojo no unido. La detección de la IgA unida se llevó a cabo como en el ELISA de sangre entera. Este ELISA de suero de tipo sándwich ha sido descrito en el resumen presentado en el 8th International Symposium on Celiac Disease en Nápoles, 1999. La especificidad del sistema ELISA tipo sándwich para mediciones de transglutaminasa se ensayó con más detalle con 15 muestras de DH y 15 de controles. Como anticuerpos de captura se usaron IgG celíaca, IgG no celíaca procedente de un sujeto deficiente en IgA, anti-transglutaminasa de ratón monoclonal y anticuerpos monoclonales de ratón de clase IgG1 irrelevante (DAKO). La IgG de paciente celíaco se recubrió igualmente de manera selectiva a la placa mediante el uso de anticuerpos de ratón monoclonales contra IgG humana (solución de Enzyme-Anti-IgG para el kit Pharmacia Gluten IgA EIA, Pharmacia Diagnostics AB; Uppsala, Suecia). Para la inmovilización de los anticuerpos monoclonales, se recubrió primeramente la placa con un anticuerpo de conejo policlonal contra IgG1 de ratón (ICN) diluido 1:500 en tampón de bicarbonato y se agregaron los monoclonales en TTBS.

Ensayo de anticuerpo transglutaminasa en suero con antígeno de roedor

La detección de anticuerpo transglutaminasa en suero mediante el uso de antígeno transglutaminasa de roedor (Sigma) se llevó a cabo de acuerdo con Sulkanen y otros, *Gastroenterology*, vol. 115, págs. 1322-1328, (1998).

Ensayo EMA

Los anticuerpos endomisiales en suero se midieron mediante un ensayo inmunofluorescente indirecto usando secciones congeladas no fijadas de 5-7 micrómetros de espesor de esófago de mono (Korponay-Szabo y otros, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 25, págs. 56-63, (1997)). Las muestras de suero se ensayaron inicialmente a diluciones de 1:2,5 y 1:10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y, cuando fueron positivas, se valoraron además a diluciones de 1:20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560. Las secciones se incubaron con las diluciones de suero y después de lavados con PBS, se detectaron los anticuerpos de pacientes IgA unidos con anticuerpos de conejo marcados con isotiocianato de fluoresceína específicos para IgA humana (DAKO). La positividad se evaluó por un observador entrenado en base a la presencia de IgA de unión a las estructuras endomisiales y fibras de tejido conjuntivo subepidérmico.

Resultados

Rendimiento del ensayo celíaco de sangre entera

El ensayo se llevó a cabo a diluciones de muestras de paciente de sangre entera de 1:10-1:50. La dilución de 1:25 se eligió para los estudios más detallados. Los valores de absorbancia para la IgA de paciente unida a la placa fueron significativamente superiores para pacientes con CD no tratada (densidad óptica a 450 nm de $0,417 \pm 0,245$) que con los controles ($0,094 \pm 0,045$), $p < 0,001$. Los pacientes tratados y los pacientes en la fase latente de la enfermedad tenían valores medios ligeramente más elevados ($0,145 \pm 0,060$ y $0,141 \pm 0,043$), respectivamente. Estos no fueron significativamente diferentes de los controles. Dado que se llevaron a cabo diversos ensayos, para el establecimiento del nivel de corte positivo los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (AU) calculadas para la muestra positiva de referencia. El nivel de corte, el cual detectó todos los pacientes de CD no tratados fue de 23 AU. Solamente un paciente

de control tenía valores de AU que excedían de este corte. De acuerdo con ello, la especificidad del ensayo fue del 97,9% y distinguió claramente los pacientes con enfermedad activa de los controles (Figura 1). La AU media para los pacientes no tratados fue de 66,3 AU (95% de intervalos de confianza, CI: 55,1-77,4), y para los pacientes tratados de 15,6 AU (CI: 11,9-19,3), para los pacientes en fase latente de 17,9 AU (CI: 11,8-23,8). La media de los controles fue de 7,2 AU (CI: 4,8-9,7).

Los estudios piloto con 12 muestras de pacientes mostraron que también los anticuerpos anti-fibronectina de conejo fueron capaces de capturar de manera eficaz los anticuerpos de pacientes transglutaminasa presumiblemente mediante el antígeno transglutaminasa y la fibronectina en la muestra (Figura 2). Un sujeto de control (no biopsiado) mostró una D.O. alta y fue posteriormente investigado por posible CD. Las placas recubiertas con fibronectina dieron igualmente positivas, pero los valores de absorbancia fueron menores y menos específicos.

Ensayo para determinar la cantidad de transglutaminasa unida a la placa

El anticuerpo monoclonal CUB 7402 detectó cantidades comparables de transglutaminasa en los pocillos incubados con muestras celiacas o de control (Figura 3). El valor de p fue de 0,16, no significativo.

Ensayo para determinar la especificidad del antígeno y la captura de anticuerpo

Las muestras de suero o plasma agregadas a los anticuerpos de captura sin los glóbulos rojos no dieron positividad específica. Cuando se agregó lisato de eritrocito a las placas recubiertas con anticuerpos de captura y las muestras de suero o plasma se agregaron únicamente después de que se habían separado por lavado los componentes de glóbulos rojos no unidos (ELISA tipo sándwich), se observó una positividad específica con las muestras de pacientes con enteropatía por gluten. El sistema ELISA tipo sándwich se exploró además con 15 muestras de dermatitis herpetiforme y 15 de control. No se observaron valores de absorbancia específicos, cuando se omitieron o bien los anticuerpos de captura específicos de transglutaminasa o bien el lisato de eritrocito, así como cuando se substituyeron con anticuerpos monoclonales irrelevantes o con un suero humano deficiente en IgA no celíaco (Figura 4). El recubrimiento selectivo de la fracción de IgG procedente de suero celíaco deficiente en IgA en la placa mediante anticuerpos monoclonales contra IgG humana dio como resultado positividad similar (densidad óptica: $0,538 \pm 0,233$) a la del recubrimiento del suero celíaco entero altamente diluido ($0,735 \pm 0,304$, no significativo, $p=0,07$).

Comparación de los resultados del ensayo de sangre entera con los del ensayo tipo sándwich

En un grupo, se reconstituyeron por separado plasma citrado congelado y glóbulos rojos de pacientes ($n=15$) en una relación similar al del hematocrito usual (60:40) y se agregaron conjuntamente a placas recubiertas con los anticuerpos celíacos IgG. En el otro grupo, se agregaron primeramente RBC normal o RBCs de pacientes a la placa y las muestras de plasma se incubaron después de separar por lavado los RBCs no unidos (ensayo de tipo sándwich). Los resultados en los dos tipos de grupos se corresponden bien (Figura 5).

Comparación de los resultados del ensayo de sangre entera de celíaco con los resultados del ensayo de anticuerpo convencional

Los resultados del ensayo de sangre entera para determinar la positividad se corresponden fuertemente con los resultados tanto de los resultados del ensayo de transglutaminasa de roedor como EMA obtenidos en los mismos pacientes celíacos no tratados y controles. Un paciente celíaco tenía EMA equívoco y dio como resultado un ensayo ELISA transglutaminasa de roedor límite. Este paciente fue claramente positivo en el ensayo de sangre entera usando su propio antígeno.

	Positivo para EMA de suero	Positivo para anticuerpos de suero que reaccionan con transglutaminasa de roedor	Positivo con el ensayo de sangre entera
CD o DH no tratado	50/51	51/51	51/51
CD tratado	0/27	3/27	5/27
CD latente	5/6	4/6	2/6
Controles	0/26*	1/26*	1/48
*Solamente se ensayaron los controles con muestras de suero disponibles			

Ejemplo 2

Uso de proteínas de captura alternativas

5 Se ensayó en qué casos otras proteínas conocidas capaces de unirse a la fibronectina del plasma serían igualmente adecuadas para capturar complejos de autoanticuerpo de paciente celíaco-transglutaminasa-fibronectina endógenos encontrados en las muestras de pacientes hemolizadas.

10 De acuerdo con ello, en experimentos adicionales, las placas ELISA se recubrieron o bien con heparina (Noparin 5000 IU/ml, Novo Nordisk NS, Dinamarca, diluida 1:500), laminina (Upstate, Lake Placid, NY, diluida 1:120, 12,5 ug/ml), colágeno L (preparado a partir de tendones de cola de rata de acuerdo con Halttunen y otros, *Gastroenterology*, vol. 111, págs. 1252-1262, (1996), diluido 1:20, 80 ug/ml) o bien con gelatina al 0,025-0,05% (Rousselot, Paris, Francia) disueltos en tampón de bicarbonato 0,03 M, pH 9,6. Las etapas adicionales de los ensayos se llevaron a cabo como en el ensayo de sangre entera con anticuerpos de captura de IgG anti-transglutaminasa humana tal como se ha
15 descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados se establecen en la Figura 6. Las placas recubiertas con heparina no dieron positividad específica con muestras de pacientes celíacos. La laminina y el colágeno I parecieron capturar los complejos anticuerpos celíacos, pero la discriminación entre los resultados con muestras celíacas y controles no fue satisfactoria. La gelatina se encontró que captura de manera eficaz los complejos autoanticuerpo-antígeno celíacos con alta densidad óptica y especificidad. Las densidades ópticas fueron constantemente más altas que las observadas con el ensayo de sangre entera usando anticuerpos de captura de IgG humana procedente de pacientes celíacos deficientes en IgA. Probando las placas después de la captura con el anticuerpo tTG monoclonal CUB7402, se encontró que se capturaron cantidades más altas de transglutaminasa a partir de las mismas muestras de sangre entera en las placas mediante gelatina que
25 mediante los anticuerpos de IgG transglutaminasa humana (densidad óptica promedio 1,485 \pm 0,727 frente a 0,729 \pm 0,343). De acuerdo con ello, podría aplicarse una dilución de muestra superior que incrementaría adicionalmente la discriminación entre muestras de pacientes celíacos y controles.

En ensayos adicionales con muestras de sangre entera procedente de 21 pacientes celíacos competentes en IgA
30 y 62 controles usando diluciones de muestras de 1:80, las densidades ópticas para las muestras celíacas fueron de 0,908 \pm 0,561 y para las de los controles fueron de 0,061 \pm 0,0480 cuando la IgA humana unida a la placa se midió a 492 nm. Los celíacos tratados (n=21) mostraron un valor medio de 0,198 \pm 0,248. En el corte, en el cual este ensayo detectó todos los celíacos no tratados, se observó una especificidad del 93,5%.

Ejemplo 3

Detección de pacientes celíacos deficientes en IgA

El uso de gelatina como un compuesto de captura permitió igualmente la medición de complejos antígeno-auto-
40 anticuerpo capturados a partir de muestras de sangre entera de pacientes celíacos deficientes en IgA, dado que esta proteína de captura no interfiere con la detección de complejos transglutaminasa-autoanticuerpo que podrían contener únicamente IgG pero no IgA.

De acuerdo con ello, el ensayo de sangre entera con captura de gelatina se llevo a cabo igualmente con una reacción final que detecta anticuerpos humanos de clase IgG unidos a la placa usando anticuerpos monoclonales contra IgG humana (kit EIA de gluten de Pharmacia) y anticuerpos de conejo conjugados con peroxidasa anti-ratón (DAKO). Con este grupo, las muestras de sangre obtenidas a partir de pacientes deficientes en IgA con enfermedad celíaca activa (n=8) se valoraron como altamente positivas (densidad óptica media 0,824 \pm 0,284), en tanto que la densidad óptica media de los controles en la detección de IgG fue de 0,118 \pm 0,053.
50

Ejemplo 4

Correlación con valores de hematocrito en sangre

55 Con el fin de evaluar si el rendimiento del ensayo de sangre entera está influenciado por la presencia de anemia, la cual podría disminuir las cantidades del autoantígeno celíaco en las muestras de sangre entera, se midieron los valores de hematocrito respectivos de los pacientes en el momento de la toma de muestra de sangre en otros ensayos clínicos. Las densidades ópticas obtenidas con el ensayo de sangre entera no mostraron correlación con los valores de hematocrito, ni en los pacientes celíacos (R=0,076) ni en el material entero (R=0,068). Incluso a valores de hematocrito tan bajos como de 0,277 (anemia severa), se obtuvieron resultados positivos con las muestras procedentes de pacientes celíacos.
60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de enfermedades inducidas por el gluten en una muestra de sangre de un sujeto, **caracterizado** porque una muestra de sangre que contiene glóbulos rojos (RBC) se hemoliza para liberar transglutaminasa tisular (tTG) a partir de los RBCs en la muestra, la tTG liberada se deja reaccionar con posibles autoanticuerpos anti-tTG en la muestra para formar un complejo antígeno-anticuerpo, y dicho complejo se ensaya, con lo cual la presencia de dicho complejo indica una enfermedad inducida por el gluten.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enfermedad a detectar es enfermedad celiaca (CD) o dermatitis herpetiforme (DH).

3. El procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizado** porque el complejo antígeno-anticuerpo se captura en un soporte sólido mediante una proteína de captura de tTG.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, **caracterizado** porque el complejo capturado se detecta mediante un inmunoensayo.

5. El procedimiento de la reivindicación 3 ó 4, **caracterizado** porque la proteína de captura de tTG es un anticuerpo anti-tTG.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado** porque el complejo antígeno-anticuerpo se captura mediante IgG anti-tTG humana.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, **caracterizado** porque el anticuerpo de captura es una mezcla de al menos dos anticuerpos de IgG humana con diferente especificidad epítipo y obtenidos a partir de pacientes celíacos deficientes en IgA.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque el complejo antígeno-anticuerpo se captura mediante fibronectina, anticuerpo de fibronectina o gelatina.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, **caracterizado** porque el inmunoensayo es un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

10. El procedimiento de la reivindicación 1, **caracterizado** porque:

i) una muestra de sangre entera se hemoliza mediante congelación y descongelación;

ii) la muestra se deja reposar durante un tiempo suficiente para que se formen los complejos antígeno-anticuerpo,

iii) la muestra se pone en contacto con IgG anti-tTG sobre un soporte sólido, y

iv) los complejos antígeno-anticuerpo capturados por la IgG anti-tTG sobre el soporte sólido son detectados mediante ELISA usando anti-anticuerpos contra IgA humana.

11. Uso de transglutaminasa tisular (tTG) liberada a partir de los glóbulos rojos (RBCs) de una muestra de sangre en un ensayo para la detección de autoanticuerpos anti-tTG en dicha muestra, con lo cual la presencia de dichos autoanticuerpos indican una enfermedad inducida por gluten.

12. Uso de un kit de ensayo que comprende (i) medios de captura para la captura de complejos autoantígeno-anticuerpo formados entre transglutaminasa tisular (tTG) liberada y autoanticuerpos anti-tTG en una muestra de sangre, y (ii) medios de detección para la detección del complejo antígeno-anticuerpo capturado en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

13. El uso de la reivindicación 12, **caracterizado** porque los medios de captura comprenden anticuerpos anti-tTG unidos a un soporte sólido y los medios de detección comprenden anti-IgA marcada, y reactivos necesarios para la detección del marcador.

14. El uso de la reivindicación 12, **caracterizado** porque los medios de captura comprenden gelatina, y los medios de detección comprenden anti-IgG, para la detección de enfermedades inducidas por gluten en sujetos deficientes en IgA.

15. uso de la reivindicación 12, **caracterizado** porque los medios de captura comprenden fibronectina, anticuerpo de fibronectina o gelatina.

16. Un procedimiento de detección de enfermedades inducidas por el gluten en una muestra de sangre hemolizada de un sujeto, **caracterizado** porque dicha muestra de sangre hemolizada, en la que la transglutaminasa tisular (tTG) que se ha liberado de los glóbulos rojos durante la hemólisis ha reaccionado con posibles autoanticuerpos anti-tTG

ES 2 314 043 T3

en la muestra para formar un complejo antígeno-anticuerpo, se hace reaccionar con una proteína de captura de tTG, después de lo cual se ensaya cualquier complejo antígeno-anticuerpo capturado, con lo cual la presencia de dicho complejo indica una enfermedad inducida por gluten.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

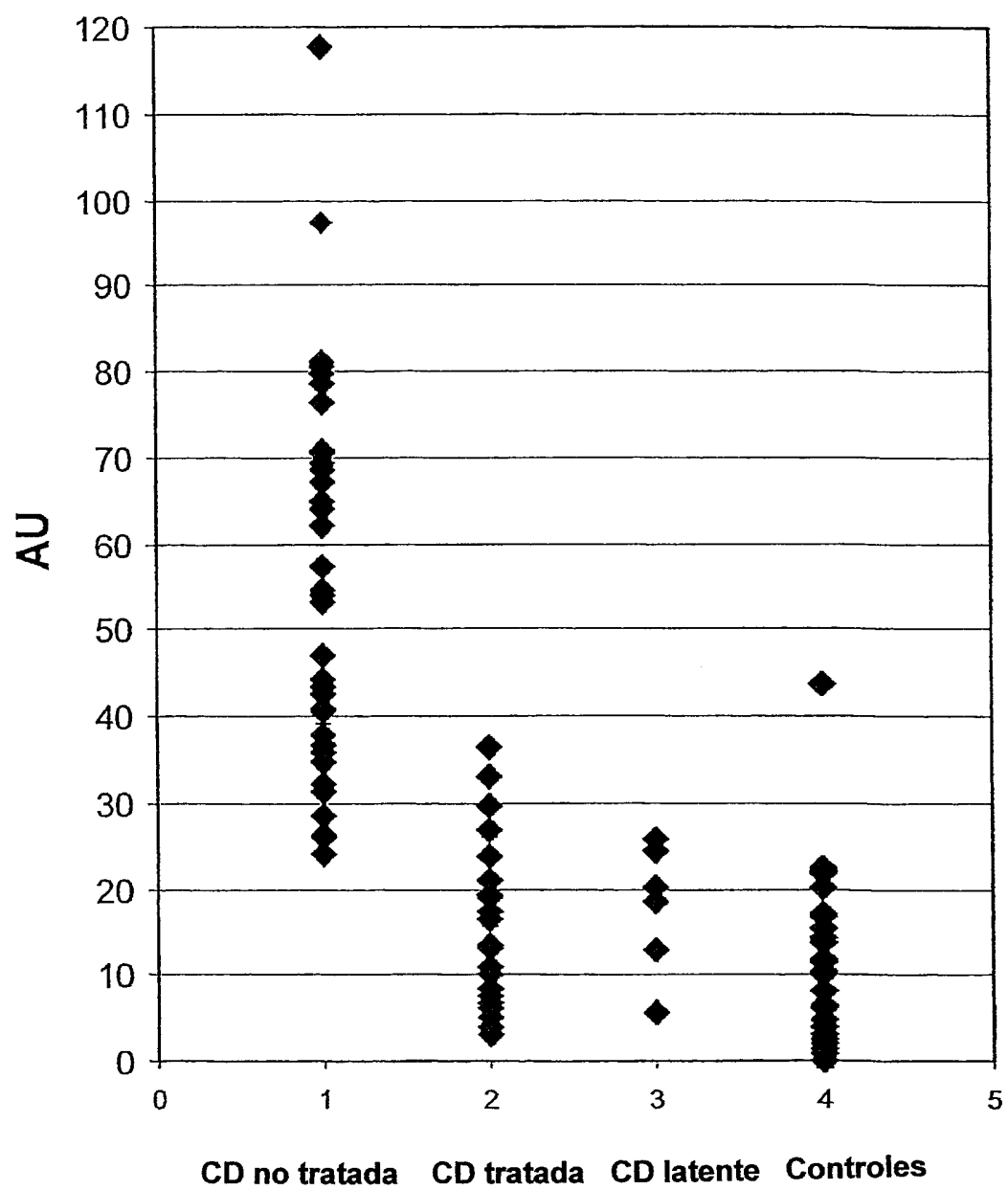


Fig.1

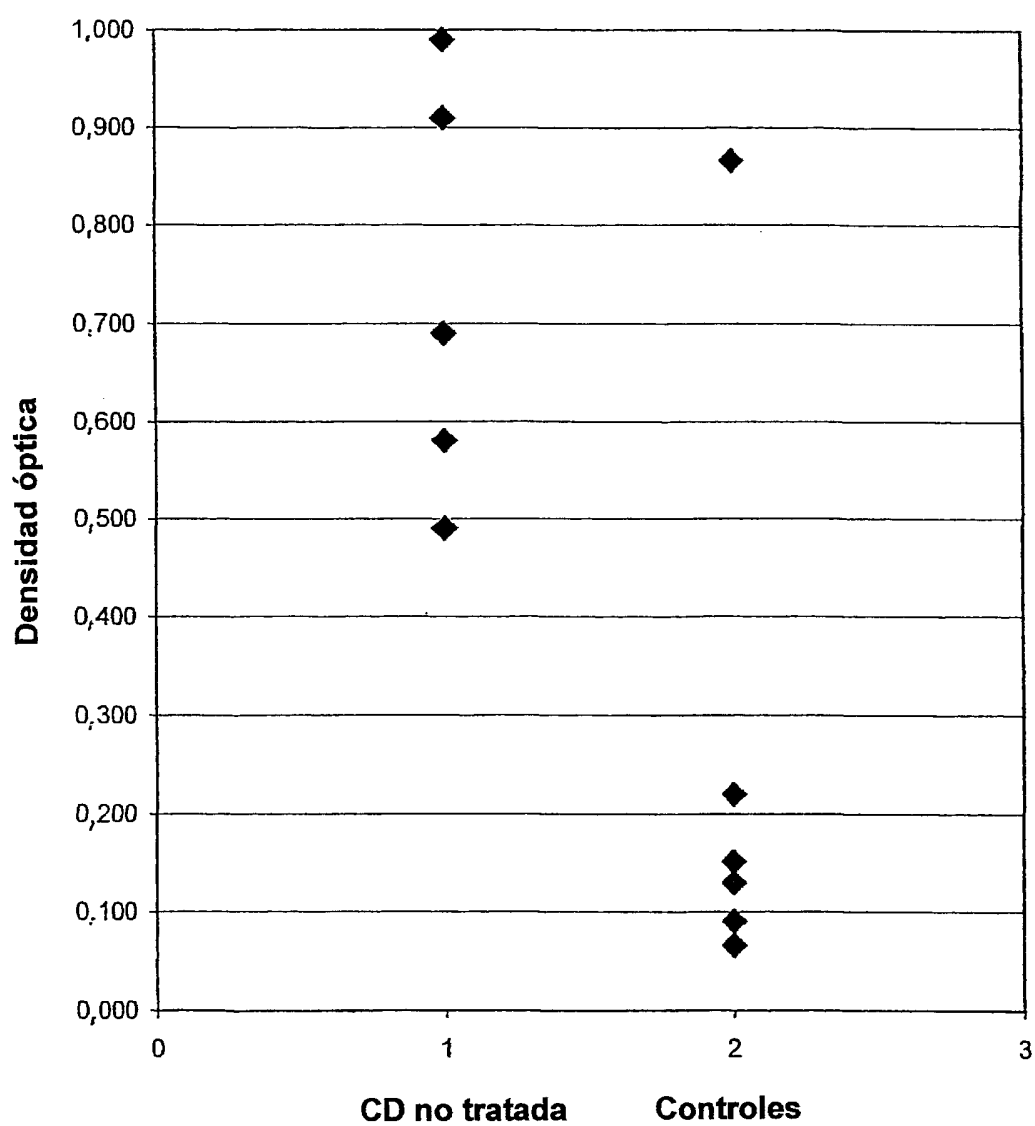


Fig.2

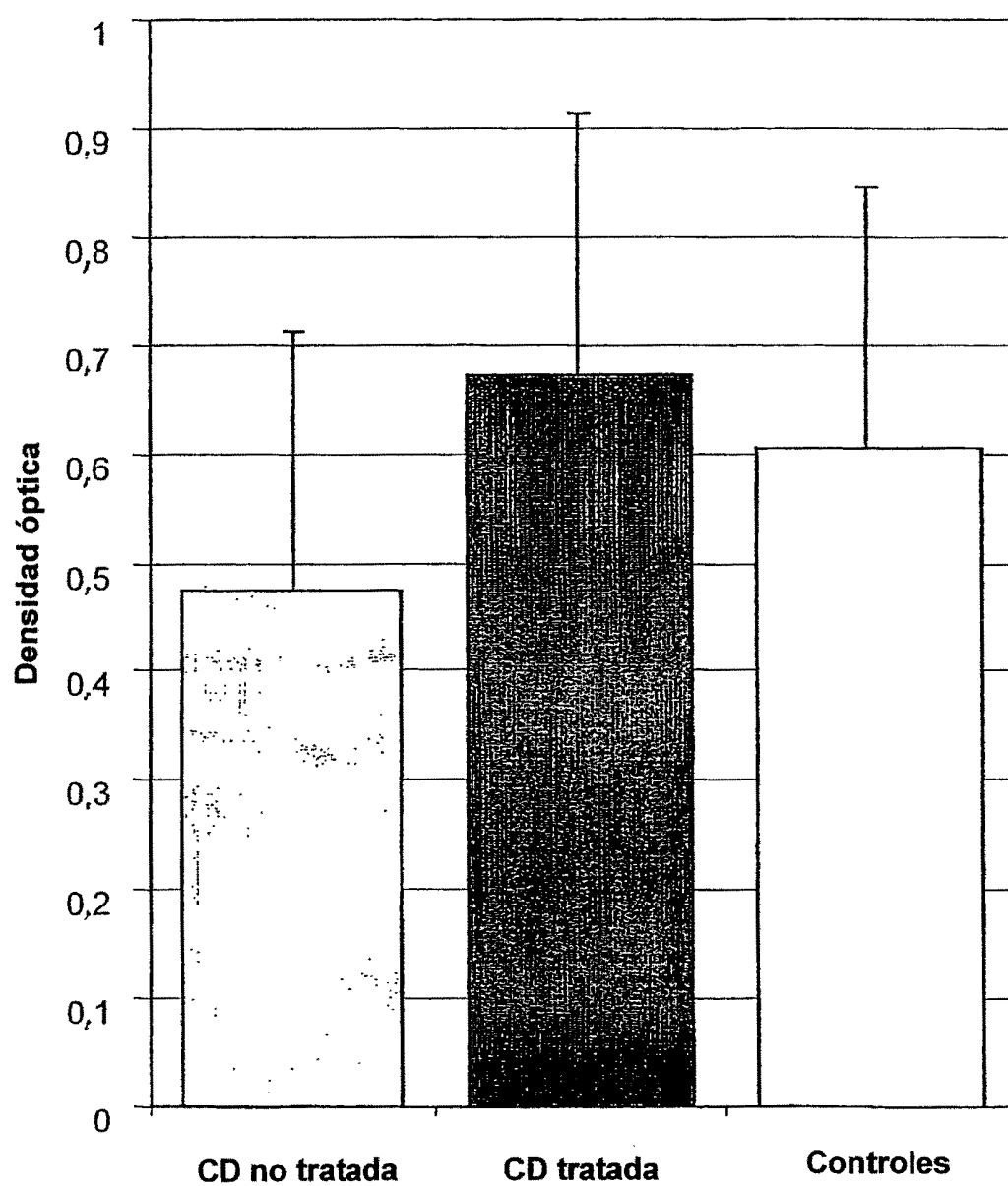


Fig.3

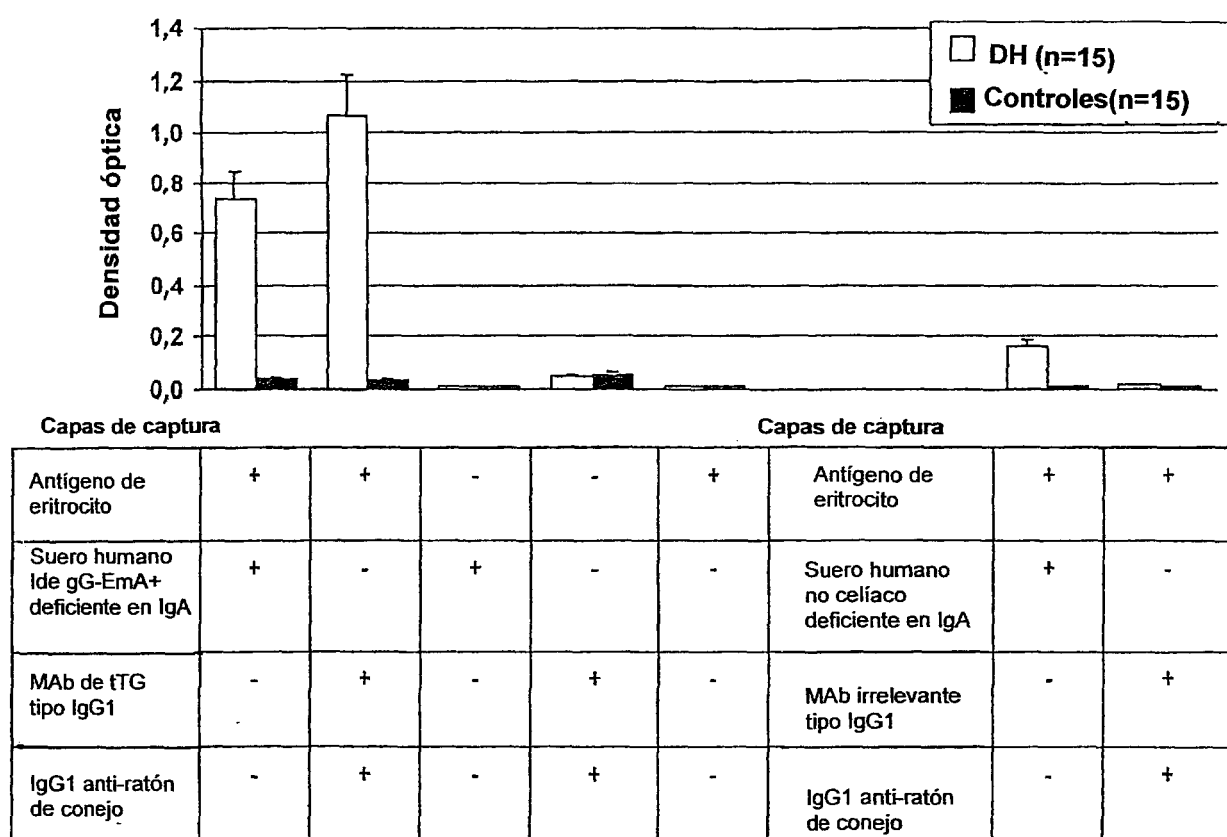


Fig.4

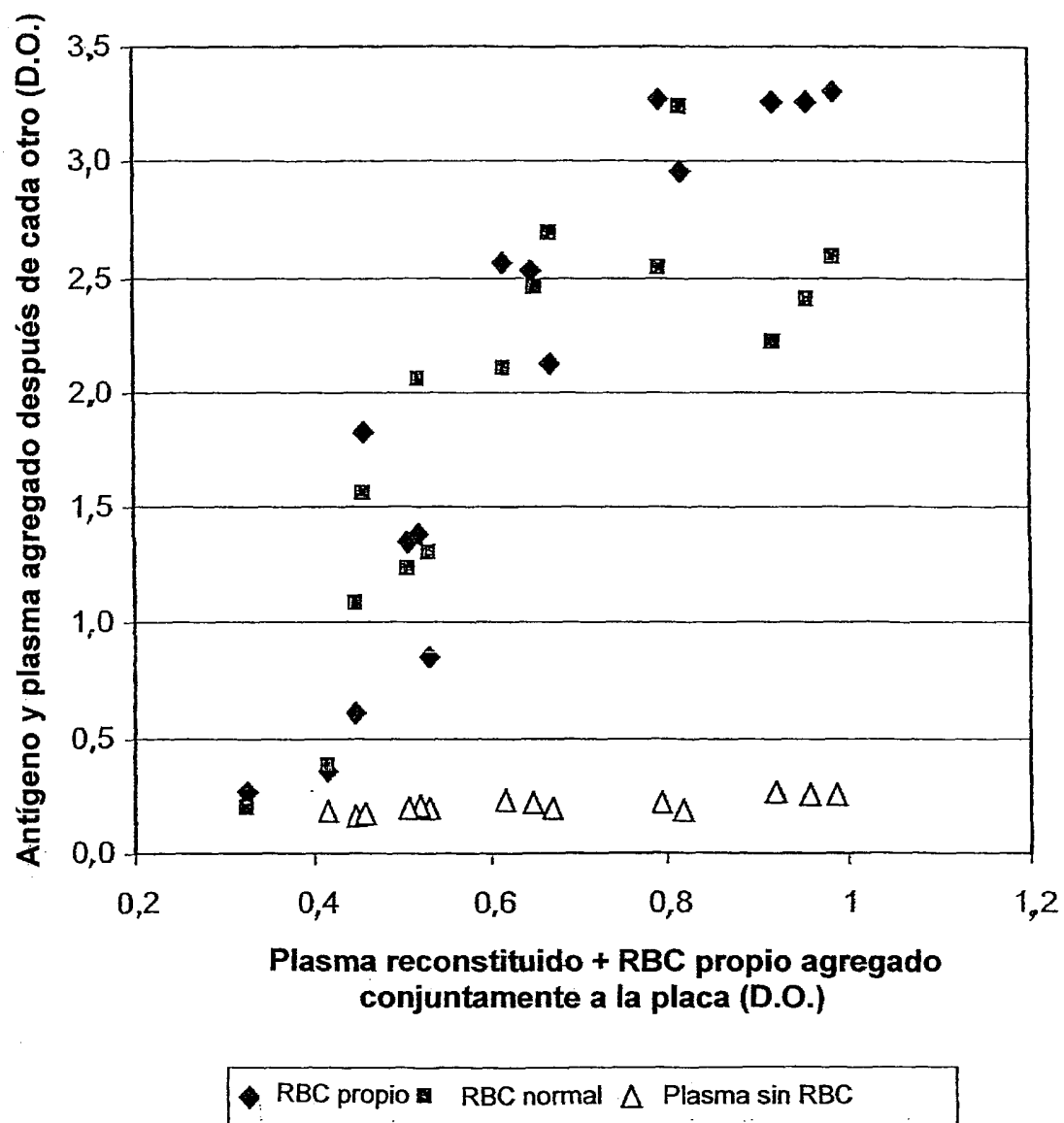


Fig.5

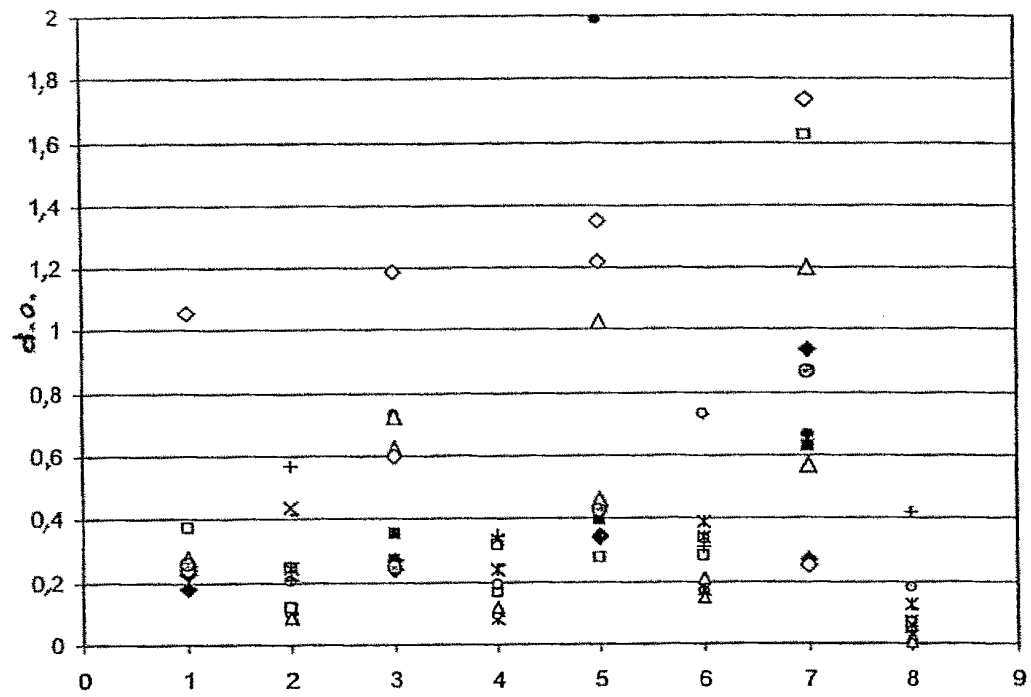


Fig.6