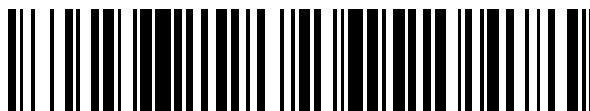


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 580**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2015 PCT/ES2015/070536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015 E 15757309 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3168617**

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

30 Prioridad:

09.07.2014 ES 201400569

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

27.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MORENO AMADOR, MARÍA DE LOURDES;
SOUSA MARTÍN, CAROLINA;
RODRÍGUEZ HERRERA, ALFONSO y
CEBOLLA RAMÍREZ, ÁNGEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 775 580 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

Detección de péptidos del gluten en fluidos humanos

5 **Objeto de la invención**

La presente invención muestra un procedimiento para la detección y cuantificación en fluidos humanos, preferentemente orina, de péptidos del gluten resistentes a la digestión gastrointestinal mediante ensayos inmunológicos. Esta metodología es aplicable en el sector médico-clínico, tanto en la verificación del cumplimiento de la dieta libre de gluten de los pacientes celíacos, pacientes con sensibilidad al gluten no celiaca, pacientes alérgicos al gluten o en pacientes con cualquier tipo de sensibilidad a las proteínas del gluten, como en el diagnóstico preciso de la enfermedad celíaca refractaria. También puede aplicarse la invención en investigación clínica de la enfermedad celíaca para comprobar la eficacia de futuras estrategias relacionadas con la eliminación o disminución de la toxicidad del gluten.

15 **Estado de la técnica**

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

Aunque la mayoría de proteínas de la dieta son digeridas por las proteasas gastrointestinales a aminoácidos simples, dipéptidos o tripéptidos, las proteínas del gluten no son completamente digeridas y permanecen en el intestino (Ganapathy et al., 2006; Fasano 2009; Comino et al., 2012). Estos péptidos son capaces de internalizarse en las células intestinales y, como consecuencia, los residuos de glutamina que poseen pueden ser desaminados por la transglutaminasa tisular (tTG). Los péptidos desaminados inducen una reacción inmunológica, produciéndose una disminución de la absorción intestinal que puede dar lugar a síntomas como diarrea, anemia, retraso del crecimiento, pérdida de peso, desórdenes óseos, complicaciones neurológicas, cáncer, etc. (Alaedini and Green, 2005; Catassi and Fasano, 2008; Tack et al., 2010).

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

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

El seguimiento de la DSG supone numerosas restricciones debido a sus implicaciones sociales y económicas. Aproximadamente más de la mitad de los alimentos que se comercializan a día de hoy contienen gluten de trigo, cebada, centeno o avena, incluyendo aquellos en los que sólo interviene como espesante o aglutinante (Freeman, 2013). El incumplimiento de la DSG se ha asociado con diarreas, dispepsia, osteoporosis, anemia por deficiencia de hierro, depresión e infertilidad, síntomas que desaparecen o mejoran, en cierta medida mediante la adhesión a la DSG. De hecho, la falta de adherencia a una DSG de manera estricta puede aumentar 4,3 veces las posibilidades de sufrir un linfoma (Lebwohl and Green, 2003). Estas observaciones nos dan una idea de la importancia de la adherencia a una DSG para reducir los síntomas, evitar deficiencias nutricionales y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, varios estudios basados en biopsias intestinales han sugerido que al menos un tercio de los pacientes con EC no se adhieren plenamente a la DSG (Ciacci et al., 2002; Silvester and Rashid, 2007; Barratt et al., 2011; Matoori et al., 2013). Además, entre un 36% y 55% de los pacientes que tienen plena adhesión a la DSG no alcanzan la remisión histológica completa, probablemente debido a ingestas involuntarias de gluten (Stoven et al., 2012; Tio et al., 2012; Hall et al., 2013; Matoori et al., 2013). No obstante, la exposición de estos pacientes al gluten a través del consumo de alimentos etiquetados como seguros pero que contienen trazas de gluten, no podría explicar el alto número de pacientes en los que no hay remisión completa de los daños histológicos de la mucosa (Koning et al., 2013).

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

gluten, la ingestión involuntaria y la hipersensibilidad a una pequeña cantidad de gluten también pueden desencadenar los síntomas propios de la patología.

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

10 Actualmente para la evaluación del cumplimiento de la DSG de los pacientes celíacos existen algunos marcadores disponibles entre los que se incluyen la observación de la mejora sintomática, entrevista dietética y reducción o normalización de anticuerpos específicos para la EC tales como anti-transglutaminasa tisular (ATT) o péptidos del gluten anti-desamidados (ADG) (Dipper et al., 2009; Sharkey et al., 2013; Vallejo et al., 2013; Vives- Pi et al., 2013). Sin embargo, no hay consenso en cuanto a la periodicidad de realización de los controles ni cuáles son las mejores medidas para evaluar dicho cumplimiento, además de que algunos de estos métodos han demostrado limitaciones significativas (Bai et al., 2012). El control con los anticuerpos ATT o ADG han sido propuestos como marcadores, sin embargo por lo general se vuelven negativos al año de comenzar la DSG además de que no implican la curación completa de la mucosa intestinal (Tursi et al, 2003; Sharkey et al., 2013). Este tipo de marcadores son útiles en la verificación de la no adherencia más que en la comprobación del estricto cumplimiento de la DSG. Por tanto, los métodos serológicos podrían no ser suficientemente sensibles para detectar transgresiones dietéticas ocasionales y que impiden la recuperación completa (Kaukien et al., 2002; 2007; Tursi et al., 2006). No son, por tanto, una manera directa de demostrar la ingesta de gluten y así evitar secuelas nocivas, de hecho, solo se pueden medir las consecuencias de las transgresiones dietéticas observando la inflamación de las mucosas y/o la atrofia vellositaria para lo cual se tendrían que realizar biopsias intestinales y como consecuencia anestesiar al paciente con los posibles riesgos, molestias y gastos médicos que conlleva.

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

35 Trabajos previos han puesto de manifiesto que los anticuerpos monoclonales anti-33 mer G12 y A1, obtenidos frente al principal péptido inmunogénico de la α -gliadina, son muy útiles en la detección de péptidos tóxicos de gluten tanto en investigación clínica como en la alimentaria (Morón et al., 2008a; 2008b; Ehren y col., 2009; Comino et al., 2012; Real et al., 2014). Recientemente se ha propuesto la determinación de los péptidos del gluten en las heces como una estrategia para la verificación directa del cumplimiento de la DSG. Los ensayos basados en los anticuerpos G12 y A1 han permitido la detección de los péptidos derivados del gluten que son excretados en las heces humanas con cierta correlación con la cantidad del gluten ingerido (Comino et al., 2012). La monitorización del gluten digerido en las heces en un grupo de voluntarios sometidos a una estricta DSG indicó que una única ingesta de gluten puede ser detectada mediante medición de dichos péptidos reactivos en heces, pudiendo determinarse su excreción entre 2-4 días, sin ingesta de gluten adicional.

45 Algunos síntomas extraintestinales de la EC tales como dermatitis herpetiforme, anemia, osteoporosis, trastorno neurológicos, etc., son difíciles de explicar sin asumir la presencia de péptidos en la sangre después de la ingesta de gluten en los pacientes celíacos (Chirido et al., 1998; Stern et al., 2001; Riestra, 2008; Ludvigsson and Green, 2011). Por tanto, las herramientas más convenientes para saber cuándo se infringe una DSG son por tanto aquellas que detectan directamente la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten en muestras humanas, ya que la presencia de estos péptidos en un enfermo celíaco sería la forma más directa e inequívoca para determinar si el individuo ha ingerido o no gluten.

50 El documento WO 2009/139887 describe un método para controlar la ingestión de gluten mediante la detección de péptidos del gluten en heces usando anticuerpos específicos para péptidos inmunogénicos resistentes a la digestión gastrointestinal.

60 La patente EP 2660593 desarrolla biomarcadores para celiaquía que son péptidos análogos de péptidos del gluten nativos. Dichos análogos son detectados en la orina.

Hasta la fecha, disponemos de escasos recursos directos para controlar el cumplimiento de la dieta en estos pacientes. La detección en heces de péptidos del gluten tiene el inconveniente de que el manejo de las muestras es incómodo y se detecta solo a partir de las 24 horas desde la ingestión y requiere un proceso extractivo de los péptidos inicial.

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

- Alaedini A, Green P. 2005. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Am. College Phys*; 142:289-298.
- Al-toma A, Verbeek WH, Mulder CJ. .2007. The management of complicated celiac disease. *Dig Dis*; 25:230-236.
- 5 Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KE, Sollid LM. 2004. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Medic*; 1:84-92.
- 10 Bai J, Zeballos E, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing MJG, Catassi C, Greco L, Cohen H, Krabshuis JH. 2012. WGOOMGE Practice Guideline Coeliac Disease. *World Gastroenterol News*; 2:S1-S8.
- Barratt SM, Leeds JS, Sanders DS. 2011. Quality of life in coeliac disease is determined by perceived degree of difficulty adhering to a gluten-free diet, not the level of dietary adherence ultimately achieved. *J Gastrointest Liver Dis*; 20:241-245.
- 15 Bernardo D, Peña AS. 2012. Developing strategies to improve the quality of life of patients with gluten intolerance in patients with and without coeliac disease. *Eur J Intern Med*; 23:6-8.
- 20 Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, et al. 2007. A prospective, double blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*; 85:160-166.
- Catassi C, Fasano A. 2008. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*; 24:687-691.
- 25 Chirido FG, Rumbo M, Añón MC, Fossati CA.1998. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol*; 33:1186-1192.
- Ciacci C, Cirillo, M, Cavallaro R, Mazzacca G. 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. *Digestion*; 66:178-185.
- 30 Comino I, Real A, de Lorenzo A, Cornell H, López-Casado MA, Barro F, Lorite P, Torres MI, Cebolla A, Sousa C. 2011. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*; 60:915-922.
- 35 Comino I, Real A, Vivas S, Síglez MÁ, Caminero A, Nistal E, Casqueiro J, Rodríguez-Herrera A, Cebolla A, Sousa C. 2012. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*; 95:670-677.
- Dessi M, Noce A, Vergovich S, Noce G Daniele N. 2013. Safety Food in Celiac Disease Patients: A Systematic Review. *Food and Nutrition Sciences*; Vol. 4 No. 7A:55-74.
- 40 Dipper CR, Maitra S, Thomas R, Lamb C A, McLean-Tooke A P, Ward R, Smith D, Spickett G, Mansfield JC. 2009. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. Anti-tissue Transglutaminase Antibodies in the Follow-up of Adult Coeliac Disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 30:236-244.
- 45 Ehren J, Morón B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. 2009. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One*; 21:e6313.
- Esteban M, Castaño A. 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ Int*; 35:438-449.
- 50 Fasano A. 2009. Surprises from celiac disease. *Sci Am*; 301:54-61.
- Freeman HJ. 2009. Adult celiac disease and its malignant complications. *Gut Liver*; 3:237-246.
- 55 Freeman HJ. 2013. Non-dietary forms of treatment for adult celiac disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*; 4:108-112.
- Ganapathy V, Gupta N, Martindale RG. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4th ed. New York, NY: Johnson LR, 2006.
- 60 Gibert A, Kruizinga A G, Neuhold S, Houben G F, Canela M A, Fasano A, Catassi C. 2013. Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr*; 97:109-116.
- 65 Hall NJ, Rubin GP, Charnock A. 2013. Intentional and inadvertent non-adherence in adult coeliac disease. A cross-sectional survey. *Appetite*; 68:56-62.

- Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, Troncone R, Ward R. 2006. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 23:559-575.
- 5 Kagnoff F. 2007. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128:S10-S18.
- Kaukinen K, Peraaho M, Lindfors K, et al. 2007. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in celiac disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 25:1237-1245.
- 10 Kaukinen K, Sulkanen S, Maki M, et al. 2002. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 14:311-315.
- Koning F, Mol M, Mearin M L. 2013. The million-dollar question: is "gluten-free" food safe for patients with celiac disease? *Am J Clin Nutr*; 97:3-4.
- 15 Lähdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Kärjä-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman DC, Mäki M. 2014. Glutenase ALV003 Attenuates Gluten-Induced Mucosal Injury in Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology*; 146:1649-1658.
- 20 Lebowitz B, Green PH. 2003. Screening for celiac disease. *N Engl J Med*; 349:1673-1674.
- Li PKT, Burdmann EA, Mehta RL. 2013. Acute kidney injury: Global health alert. *Transplantation*; 5:653-657.
- Lionetti E, Catassi C. 2011. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol*; 30:219-231.
- 25 Ludvigsson JF, Green PH. 2011. Clinical management of coeliac disease. *J Intern Med*; 269: 560-571.
- Matoori S, Fuhrmann G, Leroux JC. 2013. Celiac disease: a challenging disease for pharmaceutical scientists. *Pharm Res*; 30:619-626.
- 30 Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC, Cebolla A, Khosla C, Sousa C. 2008a. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* 3:e2294.
- 35 Morón B, Cebolla A, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas M del C, López MC, Sousa C. 2008b. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr*; 87:405-414.
- 40 Pinches M, Betts C, Bickerton S, Burdett L, Thomas H, Derbyshire N, Jones H B, Moores M. 2012. Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol Pathol*; 40:522-533.
- Osman A. et al. 2001. A monoclonal antibody that recognizes a potential celiac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*; 13:1189-1193.
- 45 Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. 2006. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*; 5:1760-1771.
- Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchán F, Gil-Humanes J, Giménez MJ, López-Casado MÁ, Torres MI, Cebolla Á, Sousa C, Barro F, Pistón F. 2012. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One*; 7:e48365.
- 50 Real A, Comino I, Moreno ML, López-Casado MA, Lorite P, Torres MI, Cebolla A, Sousa C. 2014. Identification and in vitro reactivity of celiac immunoactive peptides in an apparent gluten-free beer. *PLoS One*. 6: e100917.
- Riestra, S. 2008. Enfermedades asociadas. Polanco I. (ed.) en Libro blanco de la Enfermedad Celiaca, Madrid, España, pp. 41-49.
- 55 Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan E L, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton LJ, Murray JA. 2009. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*; 137:88-93.
- 60 Rubio-Tapia A, Murray JA. 2010. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*; 59:547-57.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*; 10:13.
- 65

- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Gray G M, Sollid L M, Khosla C. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*; 297:2275-2279.
- 5 Sharkey L M, Corbett G, Currie E, Lee J, Sweeney N, Woodward J M. 2013. Optimising delivery of care in coeliac disease-comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther*; 38:1278-1291.
- Silvester JA, Rashid M. 2007. Long-term follow-up of individuals with celiac disease: an evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol*; 21:557-564.
- 10 Stern M, Ciclitira PJ, Van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. 2001. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 13:741-747.
- Stoven S, Murray JA, Marietta E. 2012. Celiac disease: advances in treatment via gluten modification. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 10:859-862.
- 15 Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. 2010. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 7:204-213.
- Tio M, Cox MR, Eslick GD. 2012. Meta-analysis: coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*; 35:540-551.
- 20 Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. 2003. Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*; 37:387-391.
- 25 Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G M et al. 2006. Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a glutenfree diet: a 2-year prospective study. *Endoscopy*; 38:702-707.
- Tye-Din JA, Stewart JA, Dromei JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, Henderson K, Mannering SI, Gianfrani C, Jewell DP, et al. 2010. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*; 2:41ra51.
- 30 Vallejo-Diez S, Bernardo D, Moreno Mde L, Muñoz-Suano A, Fernández-Salazar L, Calvo C, Sousa C, Garrote JA, Cebolla A, Arranz E. 2013. Detection of specific IgA antibodies against a novel deamidated 8-mer gliadin peptide in blood plasma samples from celiac patients. *PLoS One*; 22:e80982.
- 35 Vives-Pi M, Takasawa S, Pujol-Autonell I, Planas R, Cabre E, Ojanguren I, Montraveta M, Santos AL, Ruiz-Ortiz E. 2013. Biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Gastroenterol*; 47:308-313.

Descripción de la invención

40 Las muestras de orina presentan un gran atractivo por su facilidad de recogida de muestra, no invasividad, simple manipulación, fácil homogeneización, bajo costo y fácil transporte y almacenamiento. Los péptidos y pequeñas proteínas (< 10 kDa) se filtran libremente por el glomérulo. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de los péptidos de bajo peso molecular o fragmentos de proteínas contenidas en la orina debido a la dificultad técnica de la medición de péptidos en presencia de proteínas en muestras diluidas y la gran diversidad de péptidos esperada.

45

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

50

La presente invención muestra un procedimiento para la monitorización no invasiva de la adherencia a la dieta libre de gluten mediante la detección y cuantificación de los péptidos inmunogénicos del gluten resistentes a la digestión gastrointestinal en orina. Dichos péptidos inmunogénicos derivados del gluten y resistentes a la degradación intestinal comprenden los epítomos de las proteínas del gluten que son detectados por los anticuerpos empleados en los ensayos inmunológicos. Por lo tanto, la presencia o ausencia de los péptidos inmunogénicos del gluten resistentes a degradación enzimática intestinal es detectada por ensayos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a los mismos. La reactividad frente a tales péptidos se puede señalar mediante técnicas inmunológicas variadas que incluyen la inmunocromatografía, biosensores, ensayos ELISA, detección con partículas magnéticas, etc. Si el fluido humano tiene poca concentración de péptidos del gluten, el procedimiento puede requerir como paso previo al ensayo inmunológico la concentración de los péptidos inmunogénicos mediante paso del fluido a través de unas columnas. Esta metodología es aplicable en el sector médico-clínico, tanto en la verificación del cumplimiento de la dieta libre de gluten de los pacientes celíacos, pacientes con sensibilidad al gluten no celiaca, pacientes con alergia al gluten o en pacientes con cualquier tipo de sensibilidad a las proteínas del gluten, así como en el diagnóstico preciso de la enfermedad celíaca refractaria (ECR), es decir, en aquellos casos donde persisten los síntomas a pesar la supuesta ausencia total de ingesta de

55

60

65

gluten. También puede aplicarse la invención en investigación clínica de la EC para comprobar la eficacia de futuras estrategias relacionadas con la eliminación o disminución de la toxicidad del gluten.

5 La presente invención tiene como objeto la aplicación de técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos que reconocen péptidos inmunogénicos derivados del gluten y resistentes a degradación intestinal en muestras de fluidos humanos.

10 La muestra es orina para detectar los péptidos al permitir disponer de mayores volúmenes que de saliva, sudor, suero, etc., facilitando por tanto el trabajo de recogida de las muestras. La aplicación preferente de la invención es la detección de la ingestión de gluten en pacientes que son diagnosticados y monitorizados por tener alguna sensibilidad al gluten. Tiene una aplicación preferente en la verificación de la ingesta de gluten durante el diagnóstico de la EC, en la comprobación del cumplimiento de la DSG de los pacientes celíacos ya diagnosticados, así como en la detección de un caso de potencial intoxicación por gluten en cualquier paciente con sensibilidad al gluten inmunotóxico. La invención se basa en emplear técnicas inmunológicas que usan anticuerpos que reconocen los péptidos inmunotóxicos del gluten y resistentes a la digestión gastrointestinal.

15 En un aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento *in vitro* para la detección y/o cuantificación del gluten ingerido por un ser humano, de aquí en adelante "método de la invención", que comprende poner en contacto un fluido biológico procedente de dicho ser humano con al menos un anticuerpo que reconoce de forma específica epítomos de las proteínas del gluten seleccionados del grupo que consiste en 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 desaminados, en donde el reconocimiento de los epítomos por los anticuerpos es indicativo de que el ser humano ha ingerido gluten.

20 En una realización particular, la cantidad de epítomos reconocidos por el anticuerpo con respecto a un control es indicativo de la cantidad de gluten ingerido y/o del tiempo que ha pasado desde la ingestión de gluten. Como entiende el experto en la materia, el control vendrá definido, por ejemplo, por el límite de cuantificación de la técnica (LQ) que puede ser calculado mediante una curva o recta de calibrado usando un patrón (como puede ser cantidades conocidas de un péptido purificado que contenga epítomos reconocidos por el anticuerpo), tal como se muestra en los ejemplos que acompañan a la presente descripción (ver Ejemplo 1). Es práctica de rutina para el experto en la materia establecer dicho LQ para averiguar la cantidad de epítomos reconocidos por el anticuerpo. Tal como se ha indicado anteriormente, dichos epítomos están comprendidos dentro de los péptidos inmunotóxicos del gluten y resistentes a la digestión gastrointestinal.

25 En la presente invención se entiende por "fluido biológico" a la orina.

30 El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, a moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) al mismo. En la presente invención, el antígeno es cualquiera de los péptidos inmunotóxicos del gluten resistentes a la digestión gastrointestinal (de aquí en adelante, péptidos de la invención) que comprenden los epítomos detectados por los anticuerpos. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados, por ejemplo, aunque sin limitación, tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Otro ejemplo de seleccionar las porciones activas de inmunoglobulinas conocidas en el estado de la técnica se realizan mediante técnicas de ingeniería genética usando las regiones variables de las inmunoglobulinas.

35 El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión "anticuerpo monoclonal" alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. No obstante, como sabe el experto en la materia, cabe mencionar que si los epítomos son muy parecidos y están relacionados entre sí, el anticuerpo monoclonal sería capaz de reconocer varios epítomos.

40 El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento del péptido de la invención, y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales.

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

50 El procedimiento de la invención comprende el menos un anticuerpo que reconoce de forma específica epítomos de las proteínas del gluten que se seleccionan de grupo que consiste en 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 desaminados. Ejemplos de anticuerpos que podrían emplearse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitar a, los anticuerpos monoclonales A1 y G12 que han sido obtenidos por reactividad frente al 33-mer de la alfa-gliadina del trigo, aunque otros anticuerpos que reconocen péptidos resistentes a digestión del gluten como el R5 o anticuerpos anti 8-mer de la omega-gliadina también podrían usarse.

En una realización particular, los anticuerpos que reconocen de forma específica epítopos de las proteínas del gluten cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos un tercio de prolínas y un tercio de glutaminas se seleccionan del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal G12, el anticuerpo monoclonal A1 y el anticuerpo monoclonal R5. Estos y otros anticuerpos monoclonales que pueden emplearse para la puesta en práctica de la presente invención están disponibles comercialmente. El anticuerpo A1 está disponible comercialmente como el anticuerpo anti-gliadina 33-mer AB-4747 de Biomedal S.L. El anticuerpo G12 está disponible comercialmente como el anticuerpo anti-gliadina 33-mer AB-4748 de Biomedal S.L. El anticuerpo R5 está disponible comercialmente bajo la marca R7001: RIDASCREEN® Gliadin (R-Biopharm), R7002: RIDASCREEN®FAST Gliadin (R-Biopharm), R7021: RIDASCREEN® Gliadin competitive (R-Biopharm), INgezim Gluten (Ingenasa).

La detección y/o cuantificación de los péptidos en fluidos humanos se puede llevar a cabo mediante ensayos inmunológicos, por ejemplo, aunque sin limitación, por inmunocromatografía con tiras de flujo lateral, inmunoprecipitación, separación inmunomagnética, arrays de proteína, inmunofluorescencia por detección por partículas fluorescentes en citometría de flujo, biosensores electroquímicos, biosensores de resonancia de plasma (ejemplo: BIACORE™), termoelectrónicos, nanomecánicos, ópticos y en definitiva, cualquier técnica inmunológica conocida que sea suficientemente sensible y específica para garantizar la detección y la cuantificación de los péptidos del gluten.

Así, en una realización particular, la puesta en contacto del fluido biológico con los anticuerpos se lleva a cabo mediante un método inmunológico seleccionado del grupo que consiste en tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, inmunopartículas magnéticas, ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, Western blot, biosensores electroquímicos, biosensores de resonancia de plasmones, biosensores termoelectrónicos y biosensores nanomecánicos. En una realización particular, la señal de la tira inmunocromatográfica se cuantifica mediante un lector.

Una forma preferente de realizarse la detección de los péptidos del gluten podría ser mediante pruebas de flujo lateral (lateral flow test) con inmunocromatografía. El procedimiento de la invención debería idealmente permitir detectar en orina una ingesta de gluten puntual equivalente a 50 mg de gluten de trigo por día, que es una cantidad situada en el rango máximo descrito para una DSG, o en su caso un mínimo de 6.48 ng de péptidos inmunogénicos de gluten (GIP) /ml de orina.

Es objeto preferente de la presente invención kits o dispositivos analíticos inmunológicos basados en anticuerpos reactivos frente a péptidos del gluten presentes en orina los cuales han demostrado ser resistentes a digestión gástrica e inmunogénicos. Probablemente estos péptidos podrían pasar al sistema sanguíneo y posteriormente ser excretados, entre ellos estarían los péptidos reconocidos por los anticuerpos A1 y G12.

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

Por otro lado, en la presente invención también se contempla el uso de técnicas inmunológicas para cuantificar detección de gluten en fluidos biológicos humanos, tales como la orina. Tal como se ha mencionado antes, los métodos inmunológicos pueden ser tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, Western blots, ELISAs, biosensores basados en reacciones electroquímicas catalizadas por enzimas acoplados a los anticuerpos, por partículas magnéticas tapizadas por anticuerpos, por resonancia de plasmones superficiales, otros biosensores ópticos, termoelectrónicos, o cualquier otro método de los existentes en el estado de la técnica con el que se pueda medir la concentración de un analito (péptidos) por un anticuerpo.

Así, tal como se ha mencionado previamente, estos métodos se caracterizan porque emplean al menos un anticuerpo con capacidad para detectar epítopos que contienen en su secuencia al menos un tercio de prolínas y un tercio de glutaminas, como son las secuencias siguientes: 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, así como sustituciones aleatorias de glutamato por glutamina en estos péptidos que podría ocurrir por desaminación mediada por transglutaminasas. En una forma preferente de la invención, los anticuerpos usados por las técnicas inmunológicas serían el G12 y por extensión el A1, por su demostrada especificidad y sensibilidad. También contempla la invención el uso de otros anticuerpos como el R5 que se suele utilizar en la medida de gluten en alimentos y que reacciona con epítopos similares

a la secuencia SEQ ID NO: 9 que también puede hallarse en péptidos del gluten resistente a digestión gastrointestinal, aunque con menor especificidad y sensibilidad ante péptidos inmunogénicos similares al péptido 33-mer, podrían tener sensibilidad suficiente al reaccionar péptidos resistentes a proteasas típicas de las prolaminas de los cereales tóxicos para celíacos.

5

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

10

Otro objeto de la invención lo constituye el uso particular de métodos inmunológicos basados en el anticuerpo monoclonal G12, A1 y R5 conjugado a un enzima que permita un ensayo cuantitativo usando sustratos cromogénicos, fluorogénicos o luminiscentes. La detección de la unión antígeno anticuerpos puede llevarse a cabo mediante sustratos que dan lugar a productos coloreados solubles que se pueden medir en un espectrofotómetro o que dan lugar a productos coloreados insolubles que forman un precipitado en el lugar en el que se encuentra el anticuerpo, sustratos que producen luz que es detectada, por ejemplo, con un luminómetro o película fotográfica, biotina, luego detectada con avidina/extractividina (acopladas a algún marcador), fluorocromos, como por ejemplo fluoresceína y rodamina, etc. Este procedimiento podría usar un patrón de gliadina, gliadina hidrolizada, el péptido 33-mer completo (SEQ ID NO: 1) o una parte de su secuencia de al menos 8 aminoácidos.

15

20

Como entiende el experto en la materia, la detección y/o la cuantificación del gluten ingerido por ser humano requiere la elaboración de una curva de calibrado que permita el análisis de los datos obtenidos en el fluido biológico para concluir si un individuo ha ingerido gluten y la cantidad de gluten ingerida.

25

Así, en una realización particular, la detección y/o cuantificación del gluten ingerido por un ser humano comprende la elaboración de una curva de calibrado mediante el empleo de péptidos que comprenden la secuencia 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 o sus derivados desaminados.

30

En otra realización particular, la detección y/o cuantificación del gluten ingerido por un ser humano comprende la elaboración de una curva de calibrado mediante el empleo de prolaminas del gluten pepsino-tripsinadas.

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

35

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

40

Por lo tanto, en una realización particular, el ser humano sigue una DSG. Así, en base a esta característica del ser humano, la detección del gluten mediante el procedimiento de la invención es indicativo de que el ser humano está incumpliendo la DSG.

45

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

50

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

55

En otra realización particular, el ser humano sigue una terapia destinada a evitar la ingesta de gluten y/o evitar la formación de péptidos inmunogénicos del gluten. En este contexto, la detección del gluten mediante el procedimiento de la invención es indicativa de que la terapia aplicada a dicho ser humano no está siendo efectiva.

60

Como entiende el experto en la materia, previamente a la puesta en contacto del fluido biológico procedente del ser humano con el anticuerpo se puede proceder a la concentración de los péptidos presentes en el fluido biológico.

65

En una realización particular del procedimiento de la invención, se realiza una preconcentración de los péptidos en las muestras de orina mediante un sistema de extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), por unión

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

5 Posteriormente los polipéptidos del gluten concentrados se eluyen con un volumen inferior de una solución adecuada compatible con la posterior cuantificación mediante métodos inmunológicos, por ejemplo las tiras
 10 inmunocromatográficas, que usen al menos un anticuerpo anti-péptidos de prolaminas, preferentemente aquellos reconocidos por los mencionados A1, G12 y R5, pero no limitados a éstos. Para poder cuantificar la cantidad de péptido, el procedimiento se podría completar usando unos patrones de referencia, o patrón estándar, con proteínas del gluten
 15 intactas, o preferentemente, polipéptidos del gluten hidrolizados por pepsina y tripsina o bien sintetizados. La intensidad de señal de cantidades conocidas de péptido patrón serviría para extrapolar la cantidad de péptido en la muestra realizando una recta patrón.

20 Como entiende el experto en la materia, cabe la posibilidad de que el método de la invención se lleve a cabo in vivo sobre un ser humano, lo cual también está contemplado dentro de la presente invención.

Por otro lado, en la presente invención también se contemplan uso de kits para poner en práctica el procedimiento de la invención. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit para la detección de gluten en fluidos biológicos, de aquí en adelante kit de la invención, que comprende:

- 25 a) un patrón estándar seleccionado de entre
 - un patrón de péptidos que comprenden la secuencia 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 o sus derivados desaminados, y
 - un patrón estándar de prolaminas del gluten pepsino-tripsinadas, y

- 30 b) al menos un anticuerpo que reconoce de forma específica epítopos de las proteínas del gluten que se seleccionan de grupo que consiste en 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 desaminados.

35 Tal como se ha indicado previamente, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa de concentración de los péptidos presentes en el fluido biológico procedente del ser humano, Para ello, se puede emplear un soporte o matriz que permite la unión físico-química de los péptidos presentes en el fluido y, posteriormente, la elución de los mismos mediante una solución acuosa tamponada. Alternativamente, también pueden concentrarse por interacción con anticuerpos específicos inmovilizados en las resinas cromatográficas o en partículas magnéticas.

40 Por lo tanto, en otra realización particular, el kit comprende un soporte sólido de unión a péptidos, y/o una solución de reacción tamponada acuosa. Estos componentes permiten la concentración de los péptidos presentes en el fluido biológico para su posterior análisis.

45 En otra realización particular del kit, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal G12, el anticuerpo monoclonal A1 y el anticuerpo monoclonal R5, que en otra realización particular, el anticuerpo está comprendido dentro de una tira inmunocromatográfica, que en otra realización particular, el anticuerpo está unido a una enzima.

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

Breve descripción de las figuras

55 *Figura 1. Relación de la concentración de los patrones de gliadina con la intensidad de la señal cuantitativa del lector de tiras IC.* El valor medio de la intensidad, desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD) se calculó para cada patrón estándar. La función Rodbard fue calculada mediante la utilización del software del Reader con los parámetros incluidos en la tabla.

60 *Figura 2A y 2B. Cinética de eliminación y aparición de GIP en muestras de orina de individuos sanos (n=13) sometidos a una dieta controlada de gluten.* Semicuantificación de péptidos/proteínas de gluten mediante tiras inmunocromatográficas con anticuerpo G12 en las muestras de orina de individuos sanos que tras consumir una DCG se sometieron a DSG hasta que los péptidos reactivos del gluten se volvieron indetectables. Tras esto, se sometieron a una DCG para comprobar la aparición nuevamente de GIP en las muestras de orina. Se recogieron entre 3 y 6 muestras de orina al día de cada individuo durante cuatro días. *Figura 2A)* Ejemplo representativo de la colección de tiras IC reaccionando con muestras de orina de un individuo que intervino en el estudio (aH6). La franja azul es un control interno positivo que indica que el dispositivo ha funcionado correctamente, y la franja rosa indica la presencia de
 65

péptidos del gluten. Figura 2B) Cinética de excreción de GIP de 4 individuos sanos (aH1-aH12). GIP, péptidos inmunogénicos del gluten; DCG, dieta normal con gluten; DSG, dieta sin gluten.

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

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

20 EJEMPLOS

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

25 En el presente ejemplo de realización se muestra cómo pueden detectarse y cuantificarse en orina los péptidos inmunogénicos del gluten, a pesar de la esperada digestión gastrointestinal, tras un proceso de preconcentración. El gluten es una mezcla compleja de proteínas que comprenden las gliadinas y gluteninas en trigo y proteínas equivalentes en la cebada, centeno y en algunas variedades de avena. Las gliadinas y gluteninas tienen una composición única de aminoácidos con un alto contenido de prolina (15%), aminoácidos hidrofóbicos (19%) y glutamina (35%); por lo tanto, forman una estructura resistente para completar la digestión por proteasas pancreáticas. Tras la reciente demostración de que las tiras inmunocromatográficas anti 33-mer de la alpha-gliadina, basadas en los anticuerpos G12, A1 y R5, pueden detectar con gran sensibilidad los péptidos de gluten hidrolizado a partir de muestras de heces y cervezas (Morón et al., 2008; Real et al., 2014; Osman et al.2001), se planteó si los péptidos del gluten también se excretan en la orina.

35 En primer lugar se llevó a cabo un ensayo en el cuál se obtuvieron muestras de orina de individuos sanos que llevaban una dieta normal que contenía gluten (DCG) (n=10). Dado que es esperable que los péptidos del gluten estén en muy bajas concentraciones en la orina, consideramos llevar a cabo una etapa de pre-concentración que posiblemente también elimine potencial material de interferencia y así se mejoren las posibilidades de detección de GIP. Los individuos voluntarios fueron divididos en dos grupos, un grupo (n=10) recibió una dieta no estandarizada en la que el gluten se consumió diariamente, y otro grupo (n=10), se sometió a DSG durante una semana. Se obtuvo consentimiento escrito de los individuos participantes. Para la realización del estudio se llevó a cabo el siguiente protocolo:

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

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

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

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

65 Para correlacionar la concentración de GIP y la señal de salida de las tiras inmunocromatográficas analizadas, el lector de tiras fue calibrado con un estándar de péptido sintético 33-mer de la alpha-gliadina y con orina de un paciente que

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

Una vez confirmada la viabilidad del método para la detección del gluten en la orina, se llevó a cabo un ensayo con la finalidad de semicuantificar el nivel de GIP en las muestras de orina. Para ello se llevó a cabo un ensayo en el que se comprobó por entrevista dietética que el gluten había sido consumido por los individuos sanos participantes en el estudio (n=10, 7 mujeres y 3 hombres, edad media 23-39 años). Los criterios de inclusión comprendieron la ausencia de enfermedades, síntomas digestivos, medicamentos, antibióticos en los últimos dos meses y ausencia de historia familiar de EC. Todos los participantes fueron evaluados para la EC, mostrando niveles de tTG sérica normales y su fenotipo HLA-DQ no fue DQ-2/-8. Los niveles de hemoglobina y el análisis de bioquímico de sangre, incluyendo las pruebas renales y hepáticas, se encontraron incluidas en el rango de los valores normales. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético local del "Hospital Virgen de Valme" (Sevilla, España). Se obtuvo consentimiento escrito de los individuos participantes. Se llevó a cabo la toma de muestra de orinas de los individuos que mantenían una dieta normal en la que estaba presente el gluten (pan, pasta, galletas, etc.). La presencia de péptidos derivados del gluten en los extractos concentrados de orina se determinó usando tiras inmunocromatográficas (IC, Glutentox Sticks) basadas en el anticuerpo G12 mediante lectura de la intensidad de la señal con un lector de tiras Glutentox Reader®. Las muestras fueron sumergidas en la solución de dilución propuesta por el fabricante. Las tiras inmunocromatográficas se sumergieron en las distintas muestras (300 µl) durante 10 minutos y se dejaron secar al aire. En este caso, todos los individuos presentaron una excreción de péptidos del gluten en orina con valores por encima de 20 ng/ml.

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

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

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

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

sólo en AH10 la señal fue claramente superior al QL. No hubo señales detectables tras la ingestión de 10 mg en ningún individuo. Las variaciones individuales observadas fueron probablemente debidas a las diferencias individuales de metabolismo y dietas, la microbiota intestinal y las variaciones en el consumo diario de alimentos.

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

En el presente ejemplo se muestra cómo se puede monitorizar la adherencia a la DSG de los pacientes celíacos mediante la determinación de péptidos inmunogénicos del gluten en orina por un sistema de detección rápido basado en las tiras IC con el anticuerpo G12 (Glutentox Stick, Biomedal, S.L.). El alto porcentaje de pacientes celíacos con recuperación parcial de la mucosa intestinal, probablemente debido a ingestiones involuntarias, ha generado la necesidad de un marcador no invasivo que permita el seguimiento a corto plazo de la adhesión a la DSG. El paso del gluten por el tracto gastrointestinal da lugar a la hidrólisis de la mayor parte de éste. Para evaluar si el método era adecuado para el seguimiento de la ingestión de gluten en pacientes celíacos, se realizó un estudio en muestras de orina de 76 individuos sanos (42 adultos y 34 niños) que consumían una DCG, y 58 pacientes celíacos en remisión (27 adultos y 31 niños) que habían sido sometidos a DSG durante > 2 años.

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

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

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

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de esta técnica para medir los péptidos derivados del gluten en orina de 24 horas como indicador de la adherencia de la DSG en pacientes celíacos. Para ello, 3 individuos sanos que seguían una DCG y 1 paciente celíaco en remisión con DSG > 2 años participaron en el estudio. Se recogieron separadamente todas las muestras de orina excretadas durante 24 horas de 4 participantes adultos. Cada muestra de orina se analizó separadamente para determinar su contenido de gluten y, a continuación, se confinaron todas las muestras de orina en un recipiente único. La detección y cuantificación de GIP por tiras IC se realizó en las 4 muestras de 24 horas. Los 3 sujetos sanos mostraron niveles de GIP en las muestras de orina individuales así como en la muestra de 24 horas, oscilando el nivel de los péptidos de gluten desde 12,4 hasta 87,6 ng/ml. Sin embargo, las muestras de orina del paciente celíaco estuvieron por debajo del QL del método así como la muestra de 24 horas. Las medidas de GIP obtenidas en muestras de orina discontinuas fueron muy similares a las obtenidas en las orinas completas 24 horas. Por lo tanto, los resultados indicaron que la medida de gluten en orina de 24 horas proporciona información valiosa sobre el valor promedio del metabolismo y la excreción de gluten consumidos por un día completo en un individuo.

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

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

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

5 El presente ejemplo muestra cómo se puede determinar la presencia de péptidos del gluten en orina usando una
partícula recubierta con anticuerpos anti-GIP. Se inmoviliza un anticuerpo frente a péptido inmunogénico del gluten, el
G12, en partículas magnéticas de 0,2 micras magnéticas. Alrededor de 0,1 mL de partículas magnéticas con una
concentración de al menos 107 partículas/mL se ponen en contacto con 2 mL de orina para capturar los péptidos que
10 pudiesen estar presentes en un eppendorf. Se realiza el procedimiento de unión y lavado de las partículas a las paredes
del tubo por los procedimientos ya habituales para los técnicos en la materia usando un imán adaptado al tubo (Life
Technologies, Miltenji, Sepmag). Se usa un anticuerpo anti-GIP conjugado a peroxidasa que se debe unir solo a las
partículas que hayan capturado un GIP con dos epítomos. Tras los lavados usando la unión y desunión a las paredes del
tubo dependiente del imán, se revela con luminol y se usa un luminómetro para cuantificar la señal. La señal por encima
del control negativo de la muestra sin GIP, indicaría la presencia de péptidos del gluten.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOMEDAL S.L.
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

20 <120> DETECCIÓN DE PÉPTIDOS DEL GLUTEN EN FLUIDOS HUMANOS

<130> PCT3007.5

<150> ES P201400569

25 <151> 2014-07-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

30

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

35

<400> 1

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

40

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

Phe

45

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

50

<213> Triticum aestivum

<400> 2

Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
1 5

55

<210> 3

<211> 6

60

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 3

65

Gln Pro Gln Leu Pro Phe
1 5

ES 2 775 580 T3

5 <210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 4

10 Gln Pro Gln Leu Pro Leu
1 5

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 5

20 Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro
1 5

25 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

30 <400> 6

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5

35 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

40 <400> 7

Gln Leu Pro Phe Pro Gln Pro
1 5

45 <210> 8
<211> 7
<212> PRT

50 <213> Triticum aestivum

<400> 8

55 Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5

60 <210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 9

65 Gln Pro Gln Pro Leu Tyr
1 5

ES 2 775 580 T3

<210> 10
<211> 8
5 <212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 10

10 Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro
1 5

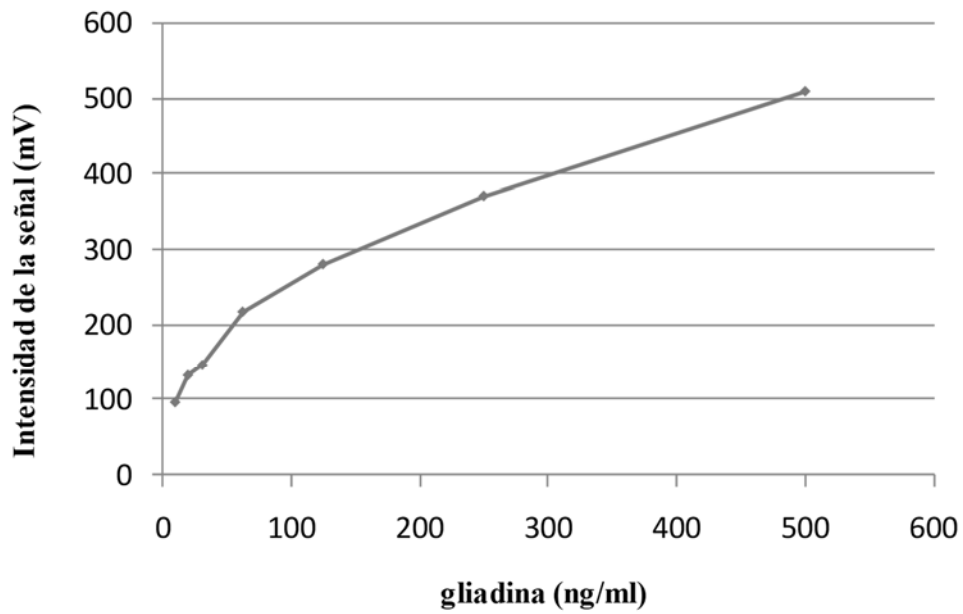
<210> 11
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 11
20 Phe Pro Leu Glu Pro Glu Glu Pro
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un procedimiento inmunológico para la detección y/o cuantificación en una muestra de orina el gluten ingerido con la alimentación por un ser humano, en donde el método inmunológico comprende al menos un anticuerpo que reconoce de forma específica epítomos de las proteínas del gluten que se seleccionan del grupo que consiste en 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 desaminados, en donde el reconocimiento de los epítomos de las proteínas del gluten por los anticuerpos es indicativo de que el ser humano ha ingerido gluten.
- 10 2. Un procedimiento *in vitro* para la detección y/o cuantificación del gluten ingerido con la alimentación por un ser humano, el cual comprende poner en contacto una muestra de orina procedente de dicho ser humano con al menos un anticuerpo que reconoce específicamente los epítomos de las proteínas del gluten que se seleccionan de grupo que consiste en 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 desaminados, en donde el reconocimiento de los epítomos por los anticuerpos es indicativo de que el ser humano ha ingerido gluten.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal G12, el anticuerpo monoclonal A1 y el anticuerpo monoclonal R5.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que la puesta en contacto del fluido biológico con los anticuerpos se lleva a cabo mediante un método inmunológico seleccionado del grupo que consiste en tiras inmunocromatográficas, inmunomicropartículas fluorescentes, inmunopartículas magnéticas, ELISA indirecto, ELISA competitivo, ELISA sandwich, Western blot, biosensores electroquímicos, biosensores de resonancia de plasmones, biosensores termoelectrónicos y biosensores nanomecánicos.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, en el que el anticuerpo monoclonal G12, anticuerpo monoclonal A1 o anticuerpo monoclonal R5 está conjugado a moléculas que permiten un ensayo cuantitativo por densitometría, fluorimetría, luminiscencia o reacción electroquímica.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que las moléculas que permiten un ensayo cuantitativo que se seleccionan del grupo que consiste en un sustrato cromogénico, un sustrato fluorogénico y un sustrato luminiscente.
- 35 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que previamente a la puesta en contacto del fluido biológico con los anticuerpos se procede a la concentración de los péptidos mediante una extracción en fase sólida.
- 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el ser humano sigue una dieta sin gluten.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la detección de gluten es indicativo de que el ser humano está incumpliendo la dieta sin gluten.
- 45 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el ser humano sigue una terapia destinada a evitar la ingesta de gluten y/o evitar la formación de péptidos inmunogénicos del gluten.
- 50 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la detección del gluten es indicativo de que la terapia aplicada a dicho ser humano no está siendo efectiva.
- 55 12. Uso de un kit que comprende
- a) un patrón estándar seleccionado de entre
- un patrón de péptidos que comprenden la secuencia 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 o sus derivados desaminados, y
 - un patrón estándar de prolaminas del gluten pepsino-tripsinadas, y
- b) al menos un anticuerpo que reconoce de forma específica epítomos de las proteínas del gluten que se seleccionan de grupo que consiste en 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 desaminados, para poner en práctica un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.
- 60 13. Uso de un kit según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal G12, el anticuerpo monoclonal A1 y el anticuerpo monoclonal R5.

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



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

FIG.1

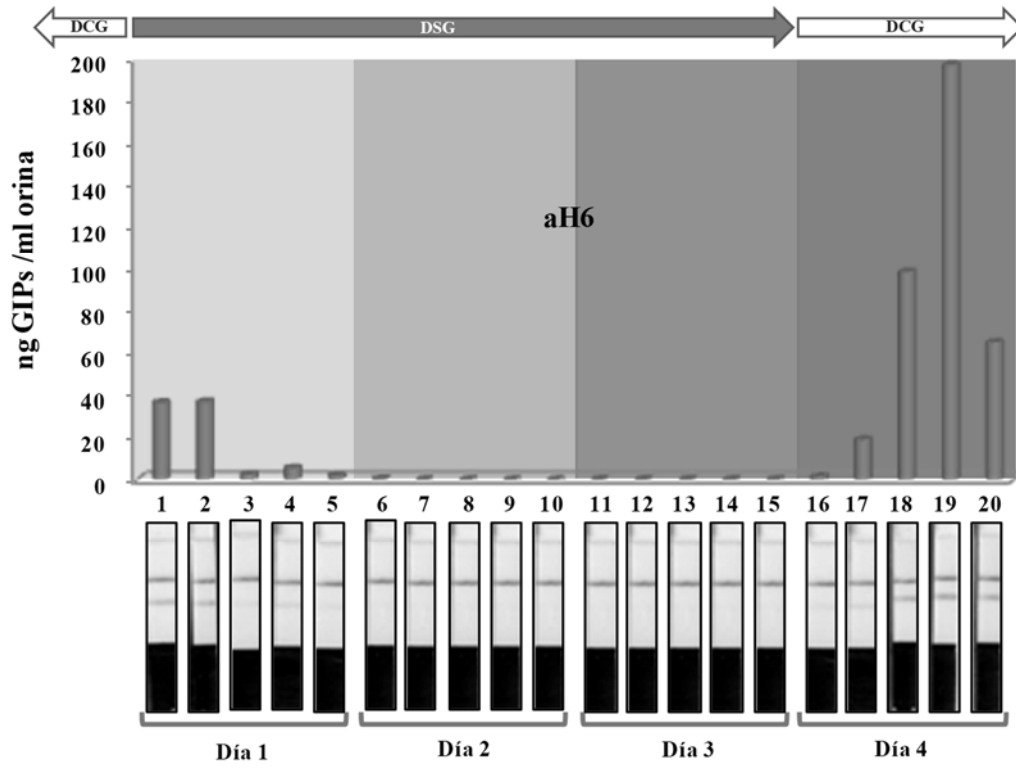


FIG.2A

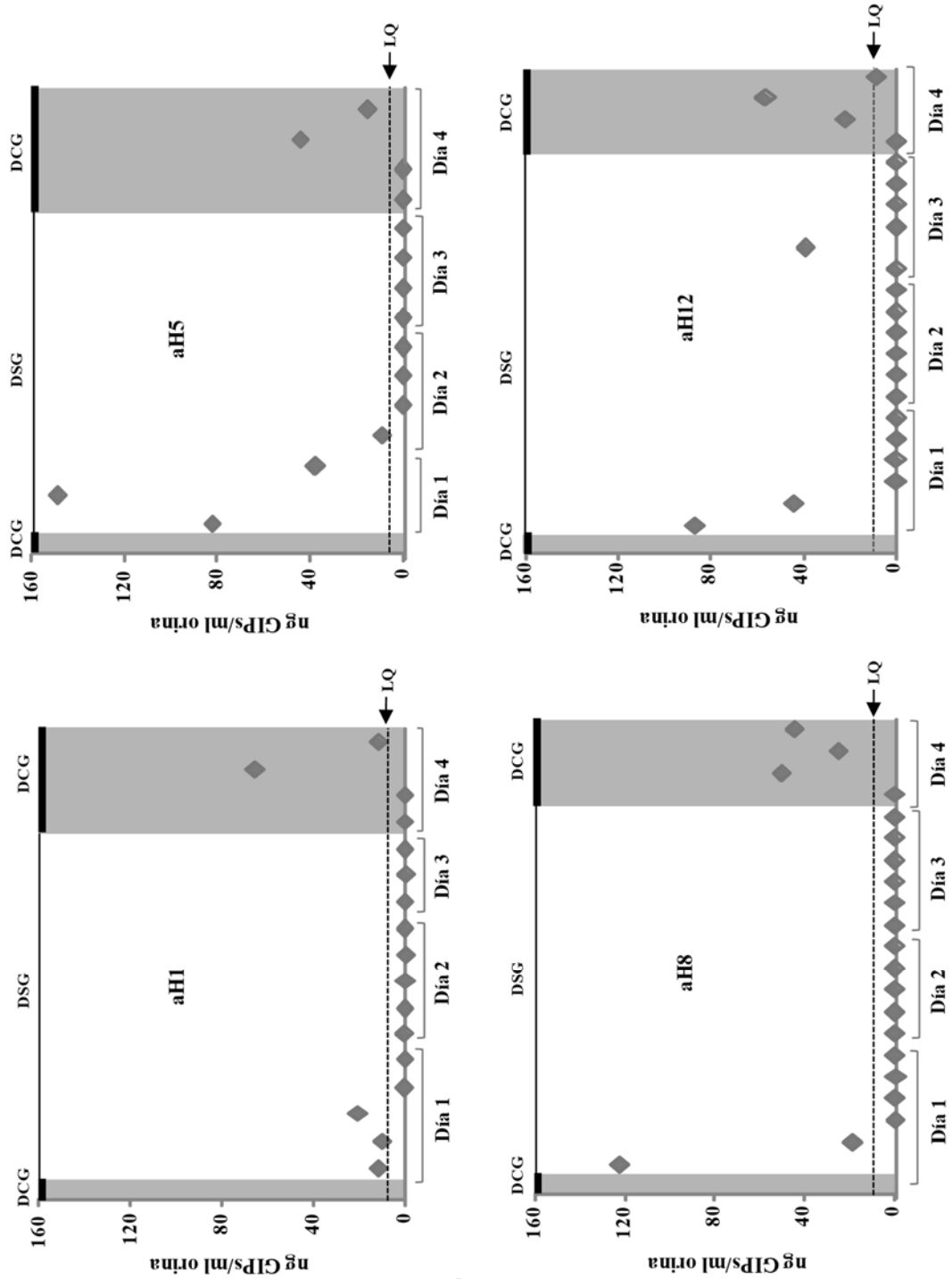


FIG. 2B

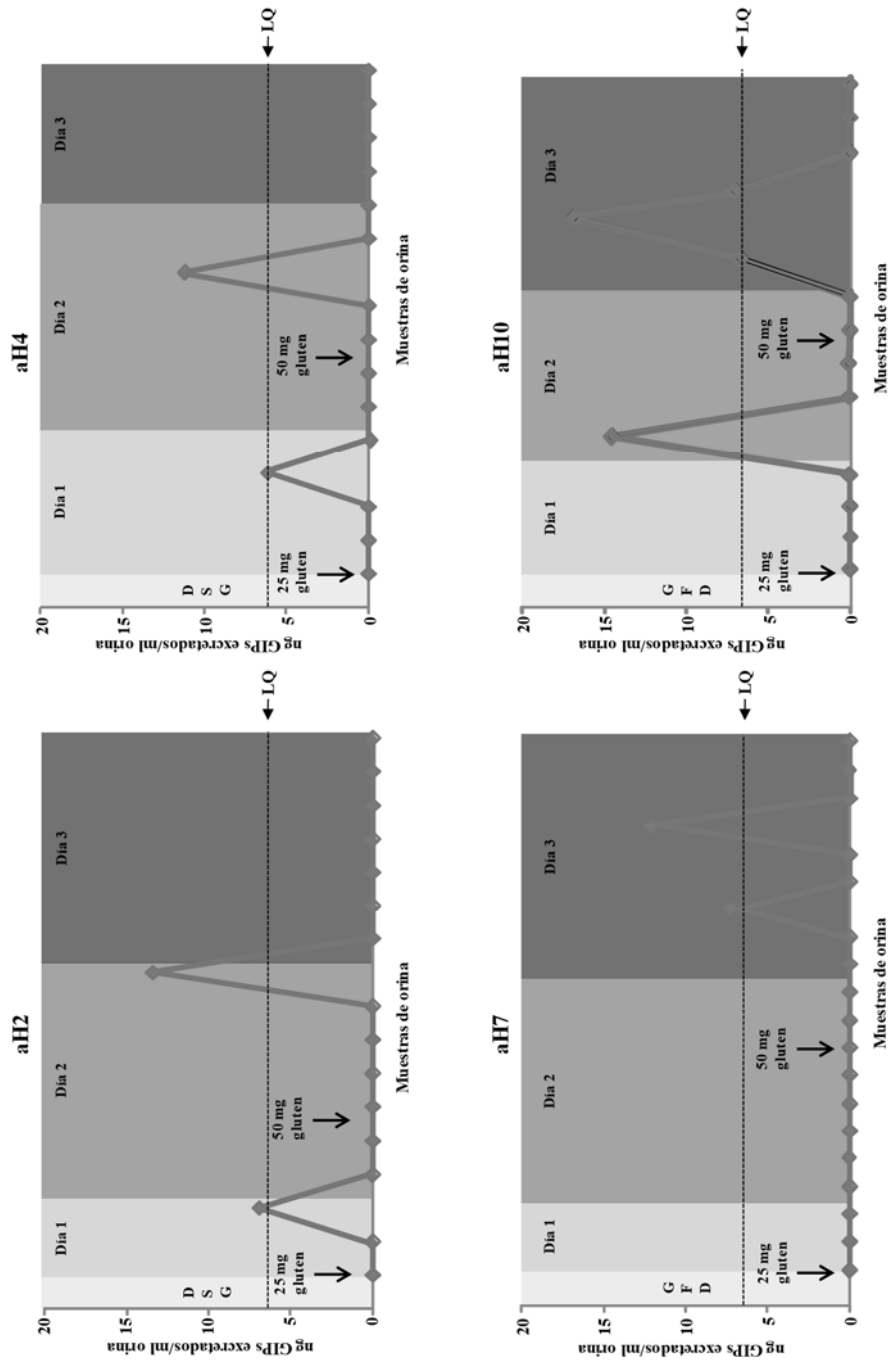


FIG.3

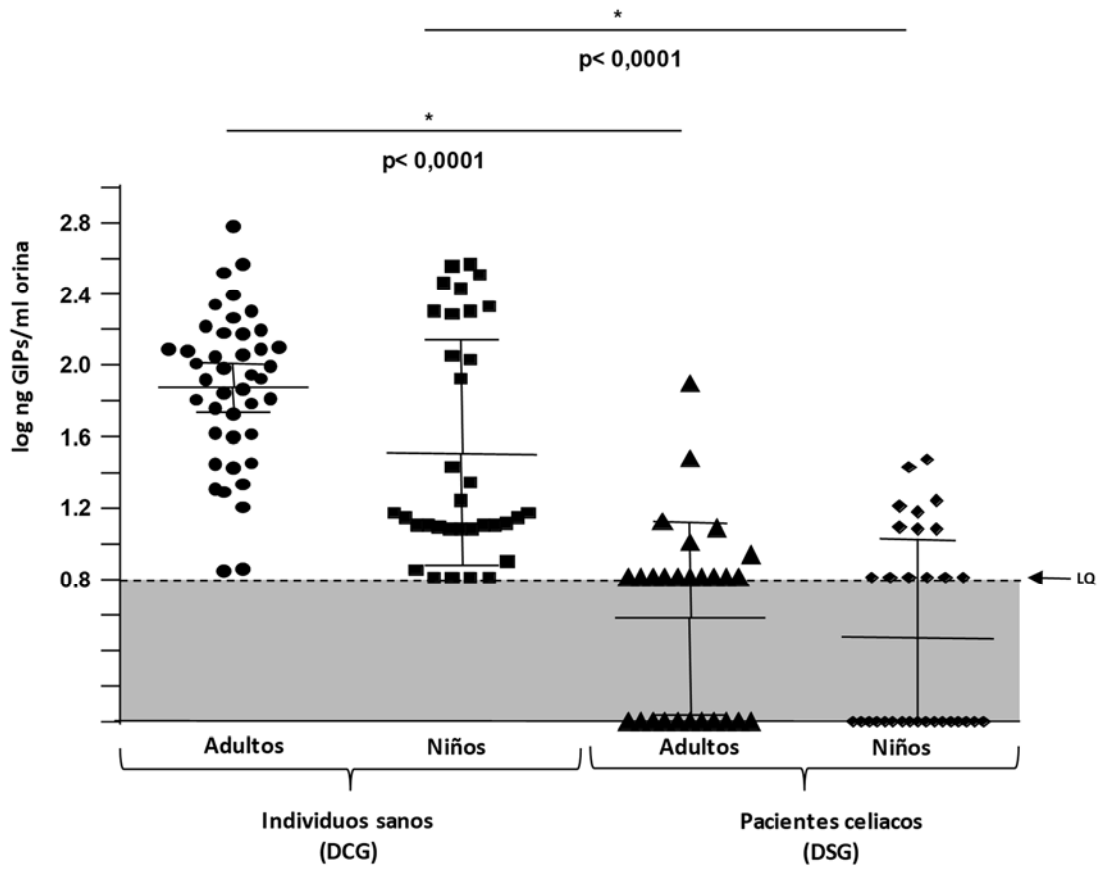


FIG.4