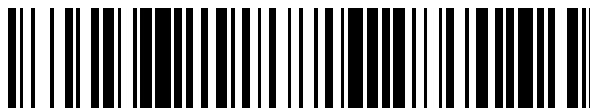


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 055**

21 Número de solicitud: 201131979

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.06.2013

Fecha de la concesión:

09.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (50.0%)
CTRA. DE UTRERA, KM. 1, EDIFICIO FRANCISCO
DE MIRANDA Nº 9
41013 SEVILLA (Sevilla) ES y
FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y
SALUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍN BERMUDO, Francisco Manuel;
SORIA ESCOMS, Bernat y
ORTEGA DE LA TORRE, Mª Ángeles**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **EMPLEO DE ANTICUERPOS ANTI-BETA-LACTOGLOBULINA EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA**

57 Resumen:

Empleo de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celiaca. Los anticuerpos anti-beta-lactoglobulina pueden ser utilizados en el diagnóstico y/o seguimiento de la enfermedad celiaca, así como en la evaluación de la respuesta y/o la adherencia a una dieta libre de gluten en enfermos celíacos.

ES 2 407 055 B1

DESCRIPCIÓN

Empleo de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con métodos y kits para el diagnóstico y/o seguimiento de la enfermedad celíaca, así como con métodos y kits para la evaluación de la respuesta y/o la adherencia a una dieta libre de gluten en enfermos celíacos. Las metodologías de la invención están basadas en la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en muestras de sangre o de suero de un sujeto que padece o es susceptible de padecer celiacía.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La celiacía o enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmune que aparece en personas genéticamente predispuestas y que se caracteriza por una inflamación crónica de la parte proximal del intestino delgado, causada por la exposición a la gliadina. La gliadina es uno de los componentes principales del gluten, por lo que el único tratamiento a día de hoy para la celiacía es la estricta ausencia de gluten en la dieta.

15 Los síntomas de la enfermedad celíaca incluyen diarrea crónica, retraso del crecimiento y/o desarrollo infantil, fatiga, erupciones en la piel, pérdida de peso, cambios en el carácter (irritabilidad, apatía, introversión, tristeza), vómitos, distensión abdominal, pérdida de apetito, fatiga, etc.

La prevalencia de la enfermedad celíaca en europeos y sus descendientes es del 1%, siendo más frecuente en las mujeres con una proporción 2:1. Habitualmente la celiacía se manifiesta durante la etapa infantil, aunque se ha demostrado que también puede manifestarse a lo largo de la etapa adulta.

20 En un intestino funcionalmente normal, la mucosa actúa, por una parte, como una barrera física entre el lumen intestinal y la submucosa, y, por otra, como un tejido paracrino que contribuye a orquestar la fisiología del intestino y su respuesta inmune. Ante un aumento de la permeabilidad intestinal, como la descrita en enfermedades con marcado componente autoinmune, como la celiacía, la integridad de la barrera física disminuye, y por tanto el sistema inmune está expuesto a más antígenos y posiblemente se hace más reactivo.

25 Los pacientes tratados con dietas libres de gluten muestran menores actividades séricas de antígenos frente al gluten. Sin embargo, esa reducida actividad al gluten, tras la introducción de este tipo de dietas, puede ser consecuencia del catabolismo de los anticuerpos ya formados, así como de una disminución de su síntesis por una menor estimulación antigénica al gluten, y no necesariamente por una mejora en la integridad de la mucosa intestinal.

30 La estrategia actual de diagnóstico para la enfermedad celíaca se basa fundamentalmente en demostrar una enteropatía dependiente del gluten, para lo cual aún se utilizan preferentemente métodos invasivos (biopsias), aunque también se analizan marcadores séricos como los anticuerpos frente a la gliadina. Sin embargo, aún no hay métodos analíticos fiables para el seguimiento de la efectividad del tratamiento propuesto, ya que el análisis histológico de biopsias duodenales no es factible como método de monitorización rutinario para analizar la remisión y eficacia del tratamiento.

35 Se ha propuesto la determinación de los niveles de anticuerpos frente a otros antígenos alimentarios, así como las medidas de la permeabilidad intestinal como métodos de diagnóstico alternativos de celiacía (Wahnschaffe U *et al.* Gastroenterology 2001; 121(6):1329-1338; Arranz E *et al.* Gut 1994; 35(4): 476-482). Estos métodos tendrían como ventaja la ausencia de requerimiento de muestras de biopsias.

40 Los métodos analíticos actuales de la enfermedad celíaca basados en el análisis histológico de biopsias duodenales tampoco permiten evaluar la adherencia a una dieta libre de gluten por parte de los celíacos. Se ha sugerido que el análisis de los cambios cuantitativos y cualitativos en anticuerpos relacionados con la enfermedad celíaca puede ser de utilidad para monitorizar la adherencia al tratamiento con dieta libre de gluten, y de hecho, algunos de los anticuerpos analizados para ello son los anticuerpos frente a la transglutaminasa (anti-tTG) y a la gliadina desaminada (AGA). Sin embargo, estos análisis no reflejan necesariamente el grado real de integridad intestinal, ya que una disminución en esos anticuerpos puede ser consecuencia de un aumento de su catabolismo o una disminución de su síntesis por menor estimulación antigénica al gluten en las dietas libres de gluten.

45 Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica, sigue existiendo la necesidad de desarrollar métodos que permitan tanto el diagnóstico como el seguimiento de la enfermedad celíaca cuya fiabilidad sea mayor o al menos aporten más información que la de los métodos descritos hasta la fecha, y que permita una monitorización rutinaria de la evolución de la enfermedad. Asimismo, se hace necesario también el desarrollo de una metodología que permita evaluar tanto la respuesta como el seguimiento a una dieta libre de gluten en los enfermos celíacos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método de diagnóstico *in vitro* de celiaquía en un sujeto que comprende

- 5 (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y
- (ii) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (i) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

10 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de dicho sujeto mayor que el nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que dicho sujeto padece celiaquía.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* de evaluación de la respuesta a una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende

- 15 (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- (ii) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iii) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (i) e (ii);

20 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ii) inferior al obtenido en (i) es indicativo de que la respuesta de dicho sujeto a la dieta libre de gluten es favorable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* de evaluación de la efectividad de una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende

- 25 (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iiia) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) e (iia),

30 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al obtenido en (ia) es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva;

o alternativamente,

- (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- 35 (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

40 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* de evaluación de la adherencia a una dieta libre de gluten por parte de un sujeto que padece celiaquía sometido a una dieta libre de gluten que comprende

- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t1;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t2, en donde t2 corresponde a un punto en el tiempo posterior a t1; y
- 45 (iiia) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) y (iia);

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al valor obtenido en (ia) es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto;

o, alternativamente,

- 5 (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y
- (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

10 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.

 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende la totalidad o parte de los elementos necesarios para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de sangre o de suero. El empleo de dicho kit para la puesta en práctica de cualquiera de los métodos proporcionados por la presente invención constituye un aspecto adicional de esta invención.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

 La **Figura 1** muestra los niveles de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en sueros de niños sanos, diabéticos, celíacos y celíacos tratados. Los niveles de anticuerpos se expresan en niveles de absorbancia. San = niños sanos; Diab = niños diabéticos; Cel = niños celíacos; CelT = niños celíacos tratados. *p<0,05; **p<0,01. N = 200.

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

 Los autores de la presente invención han encontrado que la determinación de los niveles de anticuerpos séricos frente a beta-lactoglobulina en muestras de sangre o de suero permite efectuar el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca y de la respuesta y adherencia a una dieta libre de gluten.

Método de diagnóstico de celiaquía en un sujeto (primer método de la invención)

25 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método (de aquí en adelante primer método de la invención) de diagnóstico *in vitro* de celiaquía en un sujeto que comprende:

- (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina; y
- 30 (ii) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (i) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de dicho sujeto mayor que el nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que dicho sujeto padece celiaquía.

35 El término "celiaquía" o "enfermedad celíaca" en la presente invención hace referencia a una patología autoinmune caracterizada por una inflamación crónica de la parte próxima del intestino delgado o yeyuno, causada por la exposición a la gliadina, que es uno de los componentes del gluten. La enfermedad celíaca supone una intolerancia permanente al gluten cuya característica es una reacción inflamatoria de base inmune en la mucosa intestinal que dificulta la absorción de los nutrientes.

40 El gluten es una proteína presente en cereales tales como trigo (*Triticum spp*), cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*), triticale (*Triticosecale*, cereal procedente del cruce entre trigo y centeno), kamut (*Triticum turgidum*), espelta (*Triticum spelta*) y posiblemente avena (*Avena spp*), pero ausente en arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*). El gluten se compone de gliadina y glutenina, siendo la gliadina una glucoproteína de tipo prolamina. En el sujeto que padece la celiaquía o celíaco, la ingestión de gliadina provoca que el enzima transglutaminasa tisular modifique dicha proteína y el sistema inmune origine una reacción cruzada contra el intestino delgado, causando una reacción inflamatoria que causa atrofia de las vellosidades que recubren el intestino e interferencia en la absorción de nutrientes.

45 El desarrollo de la enfermedad celíaca está determinado tanto por factores ambientales (alimentación) como genéticos. Así, la celiaquía implica también una predisposición genética ya que la mayor parte de celíacos presentan el antígeno de leucocito humano (HLA) de tipo DQ2 (HLA-DQ2) y DQ8 (HLA-DQ8) (May-Ling J. *et al.* 2010 Immunogenetics 62:641-651).

50

El término “sujeto”, tal como se usa en la invención, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

5 El término “diagnóstico”, tal como se usa en el primer método de la invención, comprende la evaluación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad, la determinación de si un sujeto tiene actualmente la enfermedad y también el pronóstico de un sujeto afectado por la enfermedad. Tal como entenderá el experto en la técnica, tal evaluación normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse, aunque preferiblemente es correcta. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los
10 sujetos pueda identificarse como que padece la enfermedad o que tiene una predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarlo de manera sencilla el experto en la técnica usando varias herramientas de evaluación estadísticas bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación de valores de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de
15 confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son preferiblemente 0,2, 0,1 ó 0,05.

En una primera etapa del primer método de la invención [etapa (i)], se determina en una muestra de sangre o de suero del sujeto el nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina.

20 El término “muestra”, tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a una muestra, susceptible de contener anticuerpos anti-beta-lactoglobulina obtenida partir del sujeto bajo estudio (salvo que se indique lo contrario), tal como una muestra de sangre o de suero obtenida a partir de dicho sujeto. En una realización particular, dicha muestra de sangre comprende sangre periférica. El término “sangre periférica” se relaciona con el volumen de sangre circulante distante del corazón, esto es, la sangre que circula por el organismo de un sujeto. La muestra de sangre puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por el técnico en la
25 materia. El término “suero”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al componente de la sangre resultante tras la coagulación de ésta y eliminación del coágulo resultante. Métodos de obtención de muestras de sangre a partir de un sujeto están ampliamente recogidos en el estado de la técnica, así como métodos de obtención de suero a partir de muestras de sangre.

30 El término “anticuerpo”, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina “antígeno”. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, es decir, que reconoce y se une de modo específico a la proteína beta-lactoglobulina, siendo dicha proteína el antígeno, a un fragmento de la misma. En una realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo humano. En una realización particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo humano con isotipo A (IgA) o G (IgG).

35 El término “beta-lactoglobulina” al que hace referencia la invención es una proteína presente en el suero de la leche, siendo secretada en la leche de ruminantes (tales como bovinos, ovinos, caprinos o cérvidos), monogástricos (tales como porcinos) y marsupiales (mamíferos terios), pero ausente en la leche de humanos, roedores y lagomorfos. De las tres proteínas alergénicas más abundantes en el suero de la leche de vaca o *Bos taurus* (caseína, alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina), la beta-lactoglobulina es la proteína soluble presente en
40 mayor concentración, alcanzando concentraciones de 2 a 4 mg/ml en el lactosuero bovino. La función de esta proteína aún no está clara, aunque supone un potente alérgeno en seres humanos. Presenta una alta resistencia a la digestión ácida del estómago.

45 La beta-lactoglobulina bovina es una proteína formada por 162 aminoácidos y un peso molecular de 18,4 kDa. En condiciones fisiológicas se encuentra preferiblemente en forma de dímero, pero se disocia en monómeros a pH por debajo de 3. Existen variantes genéticas de la beta-lactoglobulina bovina, siendo las más comunes la A (con una valina en posición 118 y un aspártico en posición 64) y la B (con una alanina en posición 118 y una glicina en posición 64).

50 La proteína beta-lactoglobulina frente a la cual se originan anticuerpos anti-beta-lactoglobulina cuyo nivel se determina en la invención corresponde a la beta-lactoglobulina procedente de animales ruminantes, monogástricos y marsupiales. Preferiblemente, la proteína beta-lactoglobulina frente a la cual se originan anticuerpos anti-beta-lactoglobulina cuyo nivel se determina en la invención corresponde a la beta-lactoglobulina de animales ruminantes (*Ruminantia*). Más preferiblemente, la proteína beta-lactoglobulina frente a la cual se originan anticuerpos anti-beta-lactoglobulina cuyo nivel se determina en la invención corresponde a la beta-lactoglobulina de bovinos (subfamilia de mamíferos placentarios que pertenece a la familia *Bovinae* e incluye los géneros *Bison*, *Bos*, *Boselaphus*,
55 *Pseudoryx*, *Syncerus*, *Taurotragus*, *Tetracerus* y *Tragelaphus*). Aún más preferiblemente, la proteína beta-lactoglobulina frente a la cual se originan anticuerpos anti-beta-lactoglobulina cuyo nivel se determina en la invención es la beta-lactoglobulina de vaca (*Bos taurus*), que comprende, sin limitarse a, tanto la vaca de origen europeo o vaca doméstica (*Bos taurus taurus*) como la vaca de origen asiático o cebú (*Bos taurus indicus*).

La beta-lactoglobulina de vaca (*Bos taurus*) se define tal como es recogida en la base de datos NCBI con número de acceso U31361 para el gen de la variante A de beta-lactoglobulina (según la versión del 31 de julio de 2001 de dicha base de datos), número de acceso DQ489319 para el gen de la variante B de la beta-lactoglobulina (según la versión del 7 de diciembre de 2006 de dicha base de datos), número de acceso AF085193 para el gen de la variante D de la beta-lactoglobulina (según la versión del 14 de octubre de 1999 de dicha base de datos).

La proteína beta-lactoglobulina no está presente en la leche humana, por lo que la generación de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se produce con la ingesta en la dieta alimenticia de leche procedente de animales tales como los indicados anteriormente o productos alimentarios derivados de esa leche. Así, en una realización particular de la invención, el sujeto tiene una dieta alimenticia que comprende leche y/o lácteos. Los lácteos, también denominados productos lácteos o derivados lácteos, comprenden aquellos productos alimenticios que son derivados procesados, generalmente fermentados, de la leche. Los derivados lácteos comprenden, sin limitarse a, mantequilla, margarina, yogur, queso, etc.

Métodos para la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en una muestra de un sujeto son conocidos por el experto en la materia. En una realización de la presente invención la determinación de los niveles de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.

El término "inmunoensayo", tal como aquí se utiliza, incluye cualquier técnica inmunoquímica basada en la formación o empleo de complejos inmunes, es decir, resultantes de la conjugación de anticuerpos y antígenos, como referencias de cuantificación de un analito (sustancia objeto de análisis) determinado, que puede ser el anticuerpo o un antígeno, usando para la medición una molécula como marcador que produce una señal detectable en respuesta a una unión específica. Dicho término incluye tanto inmunoensayos competitivos como no competitivos, así como inmunoensayos heterogéneos y homogéneos.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores incluyen elementos radiactivos (e.g., azufre, yodo, etc.); enzimas (e.g., peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, etc.); compuestos o colorantes fluorescentes (e.g., fluoresceína, rodamina, etc.), fosforescentes o quimioluminiscentes (e.g., dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc.); partículas de látex o magnéticas; partículas coloidales de oro, plata, o selenio; quelatos metálicos; coenzimas; etc. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales. Así, el complejo formado puede ser detectado o visualizado por cualquier técnica apropiada, dependiendo del marcador elegido, conocida por los técnicos en la materia, utilizando los dispositivos apropiados, por ejemplo, mediante técnicas basadas en métodos radiactivos, colorimétricos, fluorimétricos, (quimio)luminiscentes, etc., todas ellas conocidas por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, cuando el marcador es una enzima, la detección del complejo (antígeno-anticuerpo)/marcador puede llevarse a cabo poniendo en contacto dicho complejo con un sustrato apropiado y, opcionalmente, con los activadores y/o agentes de amplificación enzimáticos apropiados. Ejemplos ilustrativos de dichos sustratos incluyen:

- Para la fosfatasa alcalina:

Cromogénico: sustratos basados en p-nitrofenil fosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolium (BCIP/NPT), etc.

Fluorogénico: fosfato de 4-metilumbelifenilo (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-fluoresceín-difosfato (3,6-FDP), etc.

- Para peroxidasas:

Cromogénico: sustratos basados en ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), etc.

Fluorogénico: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex[®] Red, Amplex UltraRed, dihidroxantenos reducidos, etc.

- Para glicosidasas:

Cromogénico: sustratos basados en o-nitrofenil- β -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactósido y 4-metilumbelifenil- β -D-galactósido (MUG) para β -D-galactosidasa, etc.

Fluorogénico: resorufin- β -D-galactopiranosido, fluoresceín digalactósido (FDG), fluoresceín diglucurónido, 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil- β -D-galactopiranosido, cumarin- β -D-galactopiranosidos fluorados, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inmunoensayos adecuados para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención incluyen Western blot, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich-ELISA"), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DELFIA (fluoroimmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos), FPIA (inmunoensayo por polarización de fluorescencia), CMIA (inmunoensayo magnético quimioluminiscente), RIA (radioinmunoensayo heterogéneo y competitivo), IRMA (radioinmunoensayo heterogéneo y no competitivo), MEIA (inmunoensayo por micropartícula), luminoinmunoensayos, técnicas inmunocitoquímicas e inmuno-histoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips de biomarcadores, biosensores (e.g., inmunobiosensores) o microarrays, lab-on-a-chip que incluyen anticuerpos específicos, ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los "dipsticks", etc. En una realización particular, dicho inmunoensayo es un inmunoensayo de tipo ELISA, un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral basado en el empleo de tiras inmunocromatográficas o un inmunoensayo basado en el empleo de biosensores.

El inmunoensayo utilizado para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención puede ser utilizado para determinar la cantidad (cuantificar) de anticuerpo anti-betalactoglobulina en una muestra ya que, con muchos marcadores, e.g., enzimas, la cantidad de anticuerpo presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

En una realización particular del primer método de la invención, el inmunoensayo es un ELISA. La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas, de manera que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado resulten en la formación de complejos enzimáticamente activos. Debido a que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo) está inmovilizado en un soporte, los complejos anticuerpo-antígeno están inmovilizados en el soporte, y, por tanto, pueden ser detectados por la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable, por ejemplo, por espectrofotometría o fluorometría. En una realización particular, la proteína beta-lactoglobulina se utiliza como antígeno de soporte en una fase sólida.

En otra realización particular, el primer método de la invención contempla la detección y/o determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de sangre o de suero mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral. En una realización particular, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se determina mediante el empleo de tiras inmunocromatográficas.

Por "flujo lateral" se entiende en la presente invención el flujo de un líquido en un material en el cual los componentes que están disueltos en la muestra son transportados esencialmente por capilaridad con velocidad igual y con un flujo lateral intacto por el material.

En una realización particular de la invención, la detección y/o determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de sangre o de suero por cromatografía de flujo lateral comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto dicha muestra de sangre o de suero, susceptible de contener anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, con un primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina y el primer componente de unión, en donde dicho primer componente de unión es móvil y está embebido en una región de reacción de una tira que comprende un material poroso, en donde la tira comprende una segunda región de test, que comprende un segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en dicha tira,
- poner la tira bajo condiciones adecuadas para que el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primer componente de unión se desplace por la tira hasta alcanzar la región de test y
- detectar la unión del complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primer componente de unión al segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en la región de test de la tira,

en donde el primer y el segundo componente de unión se seleccionan del grupo formado un antígeno específico para el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, o un fragmento del mismo con capacidad de unión a dicho anticuerpo.

Por "tira que comprende un material poroso" se entiende cualquier elemento con forma de tira alargada que comprende un material poroso.

Por "materia porosa" se refiere a un material capaz de permitir el flujo lateral por su interior. Ejemplos de materiales porosos válidos son, sin limitación, copolímero de acrilonitrilo, algodón, fibra de vidrio, nitrato de celulosa, mezclas de nitrocelulosa y poliéster o celulosa, nilón (poliamidas), papel, rayón y similares.

Por “movible” se entiende que no está unido al material poroso de manera que cuando el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se ponga en contacto con la muestra de ensayo, si ésta contiene el antígeno de interés (anticuerpos anti-beta-lactoglobulina), el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina puede desplazarse por la tira por medio de flujo lateral.

El primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina estará preferentemente en forma seca o deshidratada pudiendo estar unido a un marcador. Opcionalmente, dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina puede estar acompañado de otras moléculas como conservantes, etc.

Está contemplado que la tira posea una zona o región para recibir la muestra (región de recepción) que puede ser la misma o diferente de la región donde se encuentra el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina (región de reacción). En el caso de que la región sea diferente, ambas deben estar contactadas por un material poroso de manera que la muestra pueda fluir por capilaridad hasta la región donde el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está localizado de manera que lo solubilice de manera que, si la muestra contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se forme. Adicionalmente, la invención contempla que la muestra sea cargada junto con una solución de arrastre para facilitar la disolución del primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina así como el flujo lateral.

La tira comprende un segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en una segunda región de dicha tira denominada región de test. El segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está inmovilizado en el material poroso de la tira por medio de uniones covalentes o por otro tipo de uniones. La aplicación del segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a la región de test puede ser realizada usando métodos conocidos en el estado de la técnica.

Así, en un segundo paso, la tira es puesta en condiciones adecuadas para que el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión se desplace por la tira hasta alcanzar la región de test.

La tira está estructurada de tal manera que el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina puede circular por flujo lateral hasta la región de test, en donde el segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está inmovilizado al material de la tira. Así, el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se unirá al segundo componente al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina fijado en la tira de manera que se forme una línea que puede ser detectada dependiendo del marcador usado.

En un tercer paso, se procede a detectar la unión del complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primero componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en la región de test de la tira. En una realización preferida, el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está marcado, sin embargo también se contempla que la mezcla haya sido previamente incubada con un marcador, de manera que todas las moléculas de la muestra, incluidos los antígenos (anticuerpos anti-beta-lactoglobulina) hayan sido marcados. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores que pueden ser usados así como los métodos para su detección han sido nombrados anteriormente.

El primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se selecciona del grupo formado por un antígeno específico para el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina o un fragmento del mismo con capacidad de unión a dicho anticuerpo. En una realización particular, el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es beta-lactoglobulina o un fragmento de beta-lactoglobulina con capacidad de unión a dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. En otra realización particular, el segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se selecciona entre, sin limitarse a, beta-lactoglobulina, un fragmento de beta-lactoglobulina con capacidad de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, o un anticuerpo-anti-beta-lactoglobulina secundario.

En una realización particular, está contemplado que la tira comprenda una región adicional (región control) que comprende un tercer componente de unión que se une específicamente al primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina fijado en dicha tira. En el caso de que el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina sea un antígeno (e.g., beta-lactoglobulina) o un fragmento de dicho antígeno o una mezcla de ellos, el tercer componente de unión será un anticuerpo contra ese antígeno, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con capacidad de unión al antígeno (anti-IgG). Adicionalmente, el tercer componente de unión la región control puede contener el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina que se pretende determinar.

Así, si la muestra de ensayo no presenta el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, entonces la muestra fluirá por las regiones de reacción y de test sin unirse al primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina ni al segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. Así, el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina viajará junto a la muestra y se unirá al tercer componente de unión fijado en la tira en la región de control.

En una realización alternativa de dicha tira, la región control comprende un componente de unión que se une de modo específico a un componente fijado en una región anterior de la tira, en donde dicho componente fijado a dicha región anterior de la tira es una proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. En una realización preferida, dicha proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está presente en la región de reacción de la tira. Prácticamente cualquier proteína, a excepción de la beta-lactoglobulina, diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina y que se une a un componente de unión puede estar presente en dicha realización particular de la tira inmunocromatográfica. En una realización particular, dicho componente de unión a la proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es un anticuerpo específico de dicha proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

Las distintas regiones (región de recepción, región de reacción, región de test y región de control) pueden estar separadas entre sí con la misma distancia o con distancias diferentes y estarán dispuestas, preferentemente transversalmente a la dirección del flujo. La distancia entre las distintas regiones va a depender del diseño del aparato o dispositivo de ensayo en cuestión así como de los componentes del mismo. La distancia va a variar entre 2 y 5 mm, 6-10 mm, 11-15 mm, 16-20 mm, 21-30 mm, 31-40 mm, 41-60 mm, 61-150 mm, etc. Preferentemente dicha distancia está comprendida entre 16 y 20 mm.

Existen disponibles comercialmente kits para la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos kits incluyen:

- Kits utilizados para el análisis y calidad de productos alimentarios, o para detección de fraudes alimentarios, tales como:

- kit ELISA de proteínas lácteas (beta-lactoglobulina), ELISA cuantitativo tipo sándwich, 171LG, Crystal Chem Inc. Downers Grove, Illinois, USA;
- SafePath™ Milk Residue. SafePath Laboratorios, Carlsbad, CA 92010 USA;
- Ensayo de residuo beta-lactoglobulina, ESMRDBLG-48, ELISA-Systems. Queensland, Australia;
- etc.

- Kits utilizados para el análisis en sangre:

- set de determinación ELISA de beta-lactoglobulina bovina, E10-125 Laboratorios Bethyl. Montgomery, TX 77356, USA;
- kit ELISA beta-inmunoglobulina humana, E1023h. EIAab & USCNLIFE (Wuhan EIAab Science Co.,Ltd, Wuhan, 430079, China);
- kit ELISA beta-lactoglobulina, ESBL6812. Ever Systems Biology Laboratory, Inc. Sacramento, CA 95811, USA;
- kit ELISA beta-lactoglobulina IgA/G ELISA Kit. Genesis Diagnostics Ltd, Cambridgeshire CB6 1SE, UK;
- kit ELISA beta-lactoglobulina IgG, ITC30100. Human Diagnostics Worldwide, D65205 Wiesbaden, Alemania.;
- etc.

En una realización particular de la invención, el análisis de anticuerpos humanos frente a beta-lactoglobulina bovina se puede realizar mediante kits o dispositivos analíticos adecuados, utilizando la proteína beta-lactoglobulina bovina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma (es decir, un fragmento de beta-lactoglobulina bovina con capacidad de unión a un anticuerpo anti-beta-lactoglobulina bovina) como antígeno de soporte. Para desarrollar el kit en soporte plástico hay que fijar la proteína a una fase sólida, fijando el antígeno (beta-lactoglobulina bovina o un fragmento equivalente de la misma) a una placa. El antígeno así soportado se incuba con los sueros problema, la mezcla se lava y se incuba con el anticuerpo secundario unido a un marcador (e.g., fosfatasa alcalina, etc.) y se revela. La presencia de anticuerpos frente a beta-lactoglobulina bovina como marcador de la permeabilidad intestinal asociado a la enfermedad celíaca puede ser validada posteriormente en muestras procedentes de pacientes celíacos previamente diagnosticados. Esa validación permite el desarrollo de métodos y kits analíticos (e.g., métodos basados en ELISA, inmunoensayos por cromatografía de flujo lateral, etc., tiras inmunocromatográficas de aplicación clínica, etc.), para el análisis rutinario y estandarizado de anticuerpos frente a beta-lactoglobulina bovina, de forma independiente o asociada a otros marcadores de enfermedad celíaca o adherencia a la dieta sin gluten.

En otra realización particular del primer método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpo anti-lactoglobulina se realiza mediante el empleo de un biosensor (inmunobiosensor). En una realización particular, dicho inmunobiosensor es un dispositivo que integra un sistema sensor nanoelectrónico con un reactivo biológico adecuado para la puesta en práctica de la invención. Así, en una realización particular, dicho reactivo biológico comprende beta-lactoglobulina o un fragmento de beta-lactoglobulina con capacidad de unión a un anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. Este tipo de dispositivos permite realizar inmunoensayos precisos, económicos y rápidos, de forma simple.

En una segunda etapa del primer método de la invención [etapa (ii)], se compara el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia, en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de dicho sujeto mayor que el nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que dicho sujeto padece celiaquía

El término “muestra de referencia” empleado en el primer método de la invención hace referencia a una muestra procedente de un sujeto (o conjunto de sujetos) diagnosticado como no celíaco. La muestra de referencia puede ser una muestra de sangre o de suero, tal como se ha descrito anteriormente. El nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia se determina tal y como se ha descrito anteriormente.

Tal como se utiliza en el primer método de la invención, un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa del primer método de la invención se considera “mayor” o “superior” o “por encima” del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia cuando el nivel obtenido en la primera etapa está aumentado en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100% o incluso más con respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de referencia.

En una realización particular del primer método de la invención, se determina el nivel de anticuerpos humanos anti-beta-lactoglobulina bovina, preferentemente, anti-beta-lactoglobulina de vaca, tal como se ha definido previamente.

Método de evaluación de la respuesta en un sujeto celíaco a una dieta libre de gluten (segundo método de la invención)

En un segundo aspecto, la presente invención se dirige a un método *in vitro* (de ahora en adelante segundo método de la invención) de evaluación de la respuesta a una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende

- (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- (ii) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iii) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (i) e (ii);

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ii) inferior al obtenido en (i) es indicativo de que la respuesta de dicho sujeto a la dieta libre de gluten es favorable.

Los términos “sujeto”, “celiaquía”, “gluten”, “muestra”, “beta-lactoglobulina” y “anticuerpo anti-beta-lactoglobulina” se han descrito en detalle anteriormente y se emplean con el mismo significado en el contexto del segundo método de la invención.

El término “evaluación de la respuesta” del segundo método de la invención hace referencia a la valoración del efecto (favorable, neutro o desfavorable), que tiene una dieta libre en gluten en un sujeto que padece celiaquía. Se relaciona con el efecto a corto plazo de la dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que inicia dicha dieta. Así, la evaluación de la respuesta a una dieta libre de gluten es “favorable” cuando el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina transcurrido un periodo del tiempo desde el inicio de la dieta es menor que el nivel de dicho anticuerpo antes del inicio de la dieta; asimismo se considera “desfavorable” cuando el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina transcurrido un periodo de tiempo desde el inicio de la dieta es mayor que el nivel de dicho anticuerpo antes del inicio de la dieta; y es “neutro” cuando el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina no varía sustancialmente transcurrido un periodo de tiempo desde el inicio de la dieta respecto al nivel al inicio de la dieta.

Tal como se emplea en el segundo método de la invención, el término “dieta libre de gluten” corresponde a una dieta alimenticia basada en alimentos que no contienen gluten o alimentos libres de gluten y en la que se excluyen tanto los alimentos que contienen gluten como los alimentos que pueden contener gluten.

Los alimentos pueden clasificarse en tres categorías atendiendo a su contenido de gluten: (i) libres de gluten (todos aquellos que por naturaleza no contienen gluten), (ii) que pueden tener gluten (aquellos que por naturaleza no contienen gluten pero que pueden llegar a incorporarlo por el proceso tecnológico o por contaminación cruzada) y (iii) que tienen gluten (aquellos elaborados a partir de los cereales responsables de la celiaquía tales como trigo, cebada, centeno, triticale, kamut, espelta y posiblemente avena):

- alimentos libres de gluten: este grupo comprende, sin limitarse a, leche y derivados (queso, queso de untar sin sabores, requesón, nata, yogur natural, cuajada), todo tipo de carnes y vísceras (frescas, congeladas o en conserva al natural), pescado sin rebozar (fresco o congelado), marisco fresco, pescado y marisco en conserva (al natural o en aceite), huevos, verduras, hortalizas, tubérculos, frutas, arroz, maíz, tapioca, legumbres, azúcar, miel, aceites, mantequilla, café, infusiones, refrescos (de naranja, limón o cola), vinos, bebidas espumosas, sal, vinagre de vino, especias (en rama, en grano, todas las naturales);

- alimentos que pueden contener gluten: este grupo comprende, sin limitarse a, embutidos (chóped, mortadela, chorizo, morcilla, salchichas, etc.), quesos (fundidos, de untar de sabores, especial para pizzas), conservas de carne, albóndigas, hamburguesas, conservas de pescado (en salsa, con tomate frito), salsas, condimentos, colorantes alimentarios, sucedáneos (de café, chocolate, cacao y otras bebidas de máquina, frutos secos (tostados o con harina y sal), caramelos, golosinas, algunos tipos de helados, sucedáneos de chocolate; y

- alimentos que contienen gluten: este grupo comprende, sin limitarse a, pan, harina (de trigo, de cebada, de centeno), bollos, pasteles, tartas, galletas, bizcochos, productos de repostería, pasta alimenticia (fideos, macarrones, tallarines), higos secos, bebidas destiladas o fermentadas a partir de cereales (cerveza, agua de cerveza) y en general todos aquellos productos manufacturados cuya composición comprenda harinas de los cereales citados o en cualquiera de sus formas (almidones, féculas, sémolas, proteínas).

La industria alimentaria elabora productos especiales denominados “sin gluten” que sustituyen a aquellos elaborados a partir de trigo, cebada, centeno y avena. En España, la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) ha elaborado el símbolo “controlado por FACE” para aquellas empresas que elaboran productos alimenticios sin gluten. El símbolo internacional que se utiliza para aquellos alimentos sin gluten es el de la “Espiga Barrada”. Asimismo, la FACE elabora listados de alimentos cuyo consumo es apto para celíacos.

En una realización particular de la invención, el sujeto tiene una dieta alimenticia libre de gluten que incluye leche y/o derivados lácteos.

En una primera etapa del segundo método de la invención [etapa (i)], se determina en una muestra de sangre o de suero de un sujeto que padece celiaquía el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten.

Para la puesta en práctica de este método, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se determina antes de que el sujeto que padece celiaquía inicie la dieta libre de gluten.

Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En una realización preferida del segundo método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se realiza mediante ELISA o mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral mediante, por ejemplo, el empleo de tiras inmunocromatográficas.

En una segunda etapa del segundo método de la invención [etapa (ii)], se determina en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten.

Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia.

De acuerdo con el segundo método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o suero del sujeto bajo estudio se determina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten. Dicho periodo de tiempo puede ser variable, pudiendo determinarse el nivel de anticuerpo anti-lactoglobulina al cabo de, sin limitarse a, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc.; uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años.

En una tercera etapa del segundo método de la invención [etapa (iii)], se comparan los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos a partir de una muestra de sangre o de suero de un sujeto que padece celiaquía antes del inicio de la dieta libre de gluten (primera etapa) y a partir de una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten (segunda etapa), en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa inferior al obtenido en la primera etapa es indicativo de que la respuesta de dicho sujeto a la dieta libre de gluten es favorable.

Un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa se considera “inferior” o “menor” o “más bajo” respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa cuando el valor del nivel obtenido en la segunda etapa está disminuido en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% con respecto al valor del nivel obtenido en la primera etapa.

Un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa se considera “superior” o “mayor” o “más alto” respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa cuando el valor del nivel obtenido en la segunda etapa está aumentado en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% con respecto al valor del nivel obtenido en la primera etapa.

En una realización particular del segundo método de la invención, se determina el nivel de anticuerpos humanos anti-beta-lactoglobulina bovina, preferentemente, anti-beta-lactoglobulina de vaca, tal como se ha definido previamente.

Método de evaluación de la efectividad de una dieta libre de gluten (tercer método de la invención)

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* (a partir de ahora tercer método de la invención) de evaluación de la efectividad de una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende

- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iia) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) e (iia),

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al obtenido en (ia) es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva;

o alternativamente,

- (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior o similar al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

Los términos “sujeto”, “celiaquía”, “gluten”, “dieta libre de gluten”, “muestra”, “beta-lactoglobulina” y “anticuerpo anti-beta-lactoglobulina” se han descrito en detalle anteriormente y se emplean con el mismo significado en el contexto del tercer método de la invención.

En una realización particular de la invención, el sujeto tiene una dieta alimenticia libre de gluten que incluye leche y/o derivados lácteos.

El término “evaluación de la efectividad” del tercer método de la invención hace referencia a la valoración de si el efecto que tiene una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía es favorable y si dicho efecto

además se mantiene a lo largo del tiempo. Se relaciona con el efecto a medio/largo plazo de la dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiacía y que mantiene dicha dieta.

El tercer método de la invención contempla dos alternativas. La alternativa (a) de dicho método comprende

- 5
- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
 - (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
 - (iia) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) e (iia),

10 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al obtenido en (ia) es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

La primera etapa de la alternativa (a) del tercer método de la invención [etapa (ia)] comprende determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten.

15 Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En una realización preferida del tercer método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se realiza mediante ELISA o mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral mediante, por ejemplo, el empleo de tiras inmunocromatográficas.

20 En particular, de acuerdo con la alternativa (a) del tercer método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o suero del sujeto bajo estudio se determina previamente a que dicho sujeto que padece celiacía inicie la dieta libre de gluten.

La segunda etapa de la alternativa (a) del tercer método de la invención [etapa (iia)] comprende determinar en una muestra del sujeto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten.

25 Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia.

30 De acuerdo con el tercer método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o suero del sujeto bajo estudio se determina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten. Dicho periodo de tiempo puede ser variable, pudiendo determinarse el nivel de anticuerpo anti-lactoglobulina al cabo de, sin limitarse a, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc., uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años. Como puede apreciarse, el tercer método de la invención contempla la posibilidad de efectuar determinaciones de los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina tras el inicio de la dieta libre de gluten a diferentes tiempos, o incluso periódicamente, por ejemplo, determinaciones semestrales, anuales y bianuales.

35 La tercera etapa de la alternativa (a) del tercer método de la invención [etapa (iia)] supone comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en las etapas primera (ia) y segunda (iia) de la alternativa (a) de dicho método, en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa (iia) inferior al obtenido en la primera etapa (ia) es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

40 Un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa se considera "inferior" o "menor" o "más bajo" respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa cuando el valor del nivel obtenido en la segunda etapa está disminuido en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% con respecto al valor del nivel obtenido en la primera etapa.

45 Por otro lado, el tercer método de la invención también contempla la alternativa (b) que comprende:

- 50
- (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y

- (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior o similar al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

- 5 La primera etapa de la alternativa (b) del tercer método de la invención [etapa (ib)] comprende determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten.

- 10 Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En una realización preferida del tercer método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se realiza mediante ELISA o mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral mediante, por ejemplo, tiras inmunocromatográficas.

- 15 En particular, de acuerdo con la alternativa (b) del tercer método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio se determina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten. Dicho periodo de tiempo puede ser variable, pudiendo determinarse el nivel de anticuerpo anti-lactoglobulina al cabo de, sin limitarse a, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc., uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años.

- 20 La segunda etapa de la alternativa (b) del tercer método de la invención [etapa (iib)] comprende comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa de la alternativa (b) de dicho método con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia, en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.

- 25 El término “muestra de referencia” empleado en el tercer método de la invención hace referencia a una muestra procedente de un sujeto (o conjunto de sujetos) diagnosticado como no celíaco. La muestra de referencia puede ser una muestra de sangre o de suero, tal como se ha descrito anteriormente. El nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia se determina tal y como se ha descrito anteriormente.

- 30 Tal como se utiliza en la alternativa (b) del tercer método de la invención, un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa de dicho método se considera “inferior” o “menor” o “más bajo” respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en una muestra de referencia cuando el valor del nivel obtenido en la primera etapa está disminuido en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% con respecto al valor obtenido en la muestra de referencia.

- 35 En una realización particular del tercer método de la invención, se determina el nivel de anticuerpos humanos anti-beta-lactoglobulina bovina, preferentemente, anti-beta-lactoglobulina de vaca, tal como se ha definido previamente.

Método de evaluación de la adherencia a una dieta libre de gluten (cuarto método de la invención)

- 40 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* (de ahora en adelante cuarto método de la invención) de evaluación de la adherencia a una dieta libre de gluten por parte de un sujeto que padece celiaquía sometido a una dieta libre de gluten que comprende

- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t1;
- 45 (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t2, en donde t2 corresponde a un punto en el tiempo posterior a t1; y
- (iia) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) y (iia);

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al valor obtenido en (ia) es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto;

o, alternativamente,

- 50 (ib) determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y

- (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.

Los términos “sujeto”, “celiaquía”, “gluten”, “dieta libre de gluten”, “muestra”, “beta-lactoglobulina” y “anticuerpo anti-beta-lactoglobulina” se han descrito en detalle anteriormente y se emplean con el mismo significado en el contexto del cuarto método de la invención.

En una realización particular de la invención, el sujeto tiene una dieta alimenticia libre de gluten que incluye leche y/o derivados lácteos.

El término “evaluación de la adherencia” del cuarto método de la invención hace referencia a la valoración del seguimiento de la dieta libre de gluten por parte del sujeto que padece celiacía y sigue dicha dieta. Esta valoración del seguimiento de la dieta libre de gluten por parte del sujeto celiaco permite, por un lado, determinar el grado de exhaustividad en el seguimiento de dicha dieta, es decir, determinar si la dieta efectivamente excluye o no aquellos alimentos que contienen o que pueden contener gluten y, por otro lado, detectar la existencia de celiacía refractaria en aquellos casos en los que el sujeto celiaco sigue de modo estricto la dieta libre de gluten pero sin embargo el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicho sujeto aumenta o se mantiene sustancialmente constante.

Un pequeño porcentaje de los pacientes en los que la enfermedad celíaca se manifiesta durante la etapa adulta desarrollan una resistencia primaria o secundaria a la dieta libre de gluten. Esta condición es lo que se denomina celiacía refractaria o enfermedad celíaca refractaria (RCD, del inglés “refractory celiac disease”).

La RCD puede dividirse en dos tipos: RCD tipo I y RCD tipo II. En ambos tipos, se dan signos clínicos e histológicos de la resistencia a la dieta libre de gluten. El tipo RCD II sin embargo se asocia a la presencia de una población aberrante de linfocitos intraepiteliales que carecen de la expresión del receptor de células T (TCR)-CD3 pero presentan CD3ε y reordenamientos de los genes del TCRγ. Por esta razón RCD II se considera una condición de pre-malignidad, y alrededor del 50% de los pacientes de RCD II desarrollan linfoma en un periodo de 5 años tras el diagnóstico (May-Ling J. *et al.* 2010 Immunogenetics 62:641-651).

El cuarto método de la invención contempla dos alternativas. La alternativa (a) de dicho método comprende:

- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t1;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t2, en donde t2 corresponde a un punto en el tiempo posterior a t1; y
- (iia) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) y (iia)

en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior o similar al valor obtenido en (ia) es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.

La primera etapa de la alternativa (a) del cuarto método de la invención [etapa (ia)] comprende determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t1.

Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En una realización preferida del cuarto método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se realiza mediante ELISA o mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral mediante, por ejemplo, tiras inmunocromatográficas.

En particular, de acuerdo con la alternativa (a) del cuarto método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio se determina a un tiempo t1. Dicho tiempo t1 corresponde a un momento temporal en el que el sujeto sigue una dieta libre de gluten, desde el diagnóstico de la enfermedad. El tiempo t1 puede situarse en el tiempo, sin limitarse a, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc., uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años, desde que dicho sujeto comenzó la dieta libre de gluten.

La segunda etapa de la alternativa (a) del cuarto método de la invención [etapa (iia)] comprende determinar en una muestra del sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t2, en donde t2 corresponde a un punto en el tiempo posterior a t1.

Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En particular, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se determina transcurrido un tiempo t_2 .

5 El tiempo t_2 corresponde a un momento en el tiempo posterior a t_1 y en el que el sujeto continúa en una dieta libre de gluten. El intervalo de tiempo transcurrido desde t_1 hasta t_2 puede variar ampliamente, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc., uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años, por ejemplo, 3 años, 4 años o más, etc.

10 Como puede apreciarse, el cuarto método de la invención contempla la posibilidad de realizar determinaciones del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a diferentes tiempos t_2 , todos ellos siempre posteriores a t_1 .

15 La tercera etapa de la alternativa (a) del cuarto método de la invención [etapa (iia)] comprende comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en la etapa primera (ia) y la etapa segunda (iia), en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa (iia) inferior o similar al valor obtenido en la primera etapa (ia) es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte del sujeto.

20 Un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la segunda etapa se considera "inferior" o "menor" o "más bajo" respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa cuando el valor del nivel obtenido en la segunda etapa está disminuido en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% con respecto al valor del nivel obtenido en la primera etapa.

Por otro lado, el cuarto método de la invención también contempla la alternativa (b) que comprende:

25 (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y

(iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia,

30 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.

La primera etapa de la alternativa (b) del cuarto método de la invención [etapa (ib)] comprende determinar en una muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

35 Métodos para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina han sido descritos en detalle con anterioridad y se incorporan aquí por referencia. En una realización preferida del cuarto método de la invención, la determinación del nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina se realiza mediante ELISA o mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral mediante, por ejemplo, mediante tiras inmunocromatográficas.

40 En particular, de acuerdo con la alternativa (b) del cuarto método de la invención, el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de sangre o de suero del sujeto bajo estudio se determina en un momento cualquiera a lo largo del seguimiento de la dieta libre de gluten por parte del sujeto. Dicho momento corresponde a un momento temporal en el que el sujeto sigue una dieta libre de gluten, desde el diagnóstico de la enfermedad, y puede situarse, sin limitarse a, uno o más días; una o más semanas, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas etc.; uno o más meses, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, etc., uno o más años, por ejemplo, 1 año, 2 años o más de 2 años, desde que dicho sujeto comenzó la dieta libre de gluten.

45 La segunda etapa (iib) de la alternativa (b) del cuarto método de la invención [etapa (iib)] comprende comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa (ib) de la alternativa (b) de dicho método con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia, en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa (ib) inferior o similar al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.

50 El término "muestra de referencia" empleado en la alternativa (b) del cuarto método de la invención hace referencia a una muestra procedente de un sujeto (o conjunto de sujetos) diagnosticado como no celíaco. La muestra de referencia puede ser una muestra de sangre o de suero, tal como se ha descrito anteriormente. El nivel

de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia se determina tal y como se ha descrito anteriormente.

Tal como se utiliza en la alternativa (b) del cuarto método de la invención, un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en la primera etapa del dicho método se considera "inferior" o "menor" o "por debajo" del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia cuando el nivel obtenido en la primera etapa está disminuido en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 100% respecto al nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de referencia.

En una realización particular del cuarto método de la invención, se determina el nivel de anticuerpos humanos anti-beta-lactoglobulina bovina, preferentemente, anti-beta-lactoglobulina de vaca, tal como se ha definido previamente.

Kits de la invención

En otro aspecto, la presente invención contempla kits para la determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina mediante métodos analíticos apropiados, tales como kits de ELISA y kits para inmunoensayos por cromatografía de flujo lateral, por ejemplo, tiras inmunocromatográficas. En una realización particular, dichos anticuerpos anti-lactoglobulina son anticuerpos de origen humano, por ejemplo, IgA o IgG, anti-beta-lactoglobulina bovina, preferentemente, anti-beta-lactoglobulina de vaca. Estos métodos de determinación del nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina suponen métodos analíticos rutinarios, sencillos, rápidos y considerablemente menos invasivos que el estudio de biopsias para el seguimiento de la enfermedad celíaca y su tratamiento o recuperación.

En una realización particular, dicho kit de la invención es un kit adecuado para la detección de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina mediante ELISA tal como se ha descrito anteriormente; dicho kit puede contener, además, la totalidad o parte de los elementos necesarios para la determinación y visualización de las reacciones inmunológicas entre la beta-lactoglobulina y anticuerpos frente a beta-lactoglobulina. El experto en la materia puede diseñar fácilmente kits adecuados para la detección de anticuerpos o antígenos mediante ELISA. En una realización particular, dicho kit comprende una fase sólida sobre la que se ha fijado beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma (es decir, susceptible de ser reconocido por un anticuerpo anti-lactoglobulina), opcionalmente marcado con un marcador apropiado, por ejemplo, una enzima, etc.

En otra realización particular, dicho kit de la invención comprende al menos una tira inmunocromatográfica adecuada para la realización de un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral tal como se ha descrito anteriormente; dicho kit puede contener, además, la totalidad o parte de los elementos necesarios para la determinación y visualización de las reacciones inmunológicas entre la beta-lactoglobulina y anticuerpos frente a beta-lactoglobulina. El estado de la técnica describe dispositivos adecuados para la detección de anticuerpos o antígenos mediante inmunoensayos por cromatografía de flujo lateral que comprenden al menos una tira inmunocromatográfica (véase, por ejemplo, EP 186799, EP 291194, EP 383619, etc.).

En una realización particular, la invención proporciona una tira inmunocromatográfica, adecuada para la detección de beta-lactoglobulina, preferentemente beta-lactoglobulina bovina, mediante un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral, en adelante, tira inmunocromatográfica de la invención, que comprende:

- una región de reacción, que comprende un primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, en donde dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es móvil y está embebido en un material poroso; y
- una región de test, que comprende un segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en dicha región de test;

en donde dicho primer y segundo componente de unión se seleccionan del grupo formado un antígeno específico para el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, o un fragmento de dicho antígeno funcionalmente equivalente, es decir, con capacidad de unión a dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

En una realización particular, el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es beta-lactoglobulina o un fragmento de beta-lactoglobulina funcionalmente equivalente, es decir, con capacidad de unión a dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

Un "material poroso" es un material que permite el flujo lateral por su interior. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de materiales porosos incluyen copolímero de acrilonitrilo, algodón, fibra de vidrio, nitrato de celulosa, mezclas de nitrocelulosa y poliéster o celulosa, nilón (poliamidas), papel, rayón y similares.

El término “movible” indica que no está unido al material poroso de manera que cuando el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se ponga en contacto con la muestra de ensayo, si ésta contiene el antígeno de interés (anticuerpos anti-beta-lactoglobulina), el complejo anticuerpo anti-beta-lactoglobulina-primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina puede desplazarse por la tira por medio de flujo lateral.

En una realización particular, el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina estará preferentemente en forma seca o deshidratada pudiendo estar unido a un marcador. En otra realización particular, dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina (por ejemplo, beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma), está unido y/o recubriendo unas microesferas, en donde dichas microesferas están, ventajosamente, coloreadas en un color, por ejemplo, en rojo, etc., que pueden estar en forma seca o deshidratada y se reconstituyen en contacto con la muestra. De este modo, si la muestra contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, estos se unen a la beta-lactoglobulina que está unida o recubre dichas microesferas, se forma el complejo que avanza y alcanza la región de test que contiene dicho segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, por ejemplo, beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, dispuesta en por, ejemplo, una línea, de manera que la inmunoreacción generada da lugar a una línea coloreada (e.g., roja, etc.), que sería indicativa de la presencia de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en la muestra analizada. Opcionalmente, dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina puede estar acompañado de otras moléculas como conservantes, etc.

El segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está inmovilizado en el material poroso presente en la región de test mediante uniones covalentes o por otro tipo de uniones.

Las regiones de reacción y de test pueden estar formadas por el mismo material poroso o por materiales porosos diferentes; en cualquier caso, ambas regiones están contactadas entre sí a través de un material poroso de manera que la muestra pueda fluir por capilaridad desde la región de reacción hasta la región de test.

En una realización particular, la tira inmunocromatográfica de la invención comprende una región de recepción o zona para recibir la muestra, que puede ser la misma o diferente de la región de reacción en donde se encuentra el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. En el caso de que la región sea diferente, ambas deben estar contactadas por un material poroso de manera que la muestra pueda fluir por capilaridad desde la región de recepción hasta la región de reacción.

En otra realización particular, dicha tira inmunocromatográfica de la invención comprende una región control que comprende un tercer componente de unión que se une específicamente al primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. En caso de que el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina sea beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de dicha proteína, o una mezcla de ambos, el tercer componente de unión puede ser un anticuerpo contra dicha proteína o fragmento de la misma. Adicionalmente, si se desea, el tercer componente de unión la región control puede contener el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina que se pretende determinar. De este modo, si la muestra a analizar no contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, entonces la muestra fluirá por las regiones de reacción y de test sin unirse al primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina ni al segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, y el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina viajará junto a la muestra y se unirá al tercer componente de unión fijado en la tira en la región de control.

Asimismo, en una realización alternativa, la región control comprende un componente de unión que se une de modo específico a un componente fijado en una región anterior de la tira, en donde dicho componente fijado a dicha región anterior de la tira es una proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. En una realización preferida, dicha proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está presente en la región de reacción. Prácticamente cualquier proteína, a excepción de la beta-lactoglobulina, diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina y que se une a un componente de unión puede estar presente en dicha realización particular de la tira inmunocromatográfica. En una realización particular, dicho componente de unión a la proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es un anticuerpo específico de dicha proteína diferente del anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

Las distintas regiones eventualmente presentes en la tira inmunocromatográfica de la invención (región de recepción (opcional), región de reacción, región de test, y región de control (opcional)) pueden estar separadas entre sí a la misma distancia o a distancias diferentes y estarán dispuestas, preferentemente transversalmente a la dirección del flujo. La distancia entre las distintas regiones va a depender del diseño del aparato o dispositivo de ensayo en cuestión así como de los componentes del mismo. La distancia va a variar entre 2 y 5 mm, 6-10 mm, 11-15 mm, 16-20 mm, 21-30 mm, 31-40 mm, 41-60 mm, 61-150 mm, etc. Preferentemente dicha distancia está comprendida entre 16 y 20 mm.

La tira inmunocromatográfica de la invención puede estar contenida dentro de un dispositivo, tal como es habitual en este tipo de tiras.

En una realización particular, el kit de la invención comprende, además de al menos una tira inmunocromatográfica de la invención, una solución de arrastre para facilitar la disolución del primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina así como el flujo lateral.

Asimismo, en otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de al menos una tira inmunocromatográfica de la invención el reactivo reactivos necesarios para la visualización del complejo o complejos formados. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores y reactivos para su revelado han sido mencionados previamente en esta descripción.

En una realización particular, la tira inmunocromatográfica de la invención comprende un sistema de visualización de la reacción que comprende partículas coloidales o microesferas coloreadas recubiertas con beta-lactoglobulina. A modo ilustrativa, en una realización particular, la tira inmunocromatográfica de la invención comprende:

- a) unas primeras microesferas, coloreadas en un primer color, por ejemplo, en rojo, opcionalmente, en forma seca o deshidratada y susceptibles de ser reconstituidas en contacto con la muestra a analizar, en donde dichas primeras microesferas están unidas a, o recubiertas total o parcialmente por dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, por ejemplo, beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma; y
- b) unas segundas microesferas, coloreadas en un segundo color, diferente a dicho primer color, por ejemplo, en azul, opcionalmente, en forma seca o deshidratada y susceptibles de ser reconstituidas en contacto con la muestra a analizar, en donde dichas segundas microesferas están unidas a, o recubiertas total o parcialmente por una proteína-control, en donde dicha proteína-control es una proteína diferente a dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.

De acuerdo con esta realización particular, si la muestra contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, estos se unen a la beta-lactoglobulina que está unida o recubre dichas primeras microesferas, el complejo formado avanza y alcanza la región de test que contiene dicho segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, por ejemplo, beta-lactoglobulina o un fragmento funcionalmente equivalente de la misma, dispuesta en por, ejemplo, una línea, de manera que la inmunoreacción generada da lugar a una línea coloreada (e.g., roja), que sería indicativa de la presencia de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en la muestra analizada. Paralelamente, una vez reconstituidas dichas segundas microesferas (e.g., coloreadas en azul) por acción de la muestra, avanzan hasta alcanzar la región control en la que se han fijado unos anticuerpos frente a dicha proteína-control, con lo que tiene lugar una reacción inmunológica entre dicha proteína-control y dicho anticuerpo frente a dicha proteína-control y generando como resultado una banda coloreada (azul en este caso). Cuando la muestra analizada no contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, entonces solo se desarrolla una banda de control de color azul (en este caso), mientras que si la muestra analizadas contiene anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, además de la banda azul, se desarrolla una banda de color rojo (en este caso), al cabo de un cierto tiempo, típicamente, del orden de minutos, por ejemplo, al cabo de al menos 1 minuto, típicamente, entre 3 y 15 minutos, habitualmente entre 5 y 10 minutos. En caso de que no aparezca ninguna de las dos bandas el análisis no sería válido. Esta realización particular, posibilita un control sencillo de la reacción.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Determinación de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en sueros de niños

1.1 Metodología: ELISA

La técnica de ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) se utilizó para buscar la presencia de anticuerpos IgG anti-beta-lactoglobulina en el suero de niños sanos, diabéticos, celíacos o con ambas enfermedades. Al utilizar el ELISA de forma cualitativa no se tuvieron que realizar curvas patrón para cuantificar la cantidad de anticuerpo, sino que únicamente se buscó la presencia o ausencia del anticuerpo en los distintos sueros.

Para realizar el ELISA primero se fijó la proteína a la fase sólida, fijando el antígeno beta-lactoglobulina a una placa de 96 pocillos, mediante una disolución de 1 mg/ml de beta-lactoglobulina en un tampón CO₃Na₂ (carbonato)- CO₃HNa (bicarbonato) 0.05 M durante toda la noche, pH 9,6 y a 4° C en cámara húmeda. Pasadas 12 h se procedió a la eliminación de la proteína en exceso mediante 3 lavados con 200 µl de PBS-0.5 % Tween 20 (PBST). Una vez unida la beta-lactoglobulina, se incubó 2 h a temperatura ambiente con 200 µl por pocillo de una dilución 1/100 de cada uno de los sueros problema en PBST. Luego, se eliminó el anticuerpo que no había sido retenido mediante 3 lavados con 200 µl de PBST. Se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario unido a la enzima, con 200 µl de una dilución de 1/3700 del anticuerpo anti IgG humano unido a

fosfatasa alcalina (Sigma) en PBST. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando 3 veces con 200 µl de PBST. Después se reveló con una tableta de sal disódica hexahidratada de 4-nitrofenil/fosfato (Sigma) por cada 6 ml de tampón de dietanolamina, asegurando siempre que el tampón tuviera un pH de 9,8. Se utilizaron 200 µl de esta disolución por pocillo, se dejó que tuviera lugar la reacción colorimétrica a temperatura ambiente. Pasados 30 min se paró la reacción con 75 µl de NaOH 3 N por pocillo y se procedió a leer su densidad óptica a 405 nm. La existencia de coloración amarilla indicó la presencia de anticuerpo anti beta-lactoglobulina y la coloración incolora indicó la ausencia de este anticuerpo.

En todos los casos se realizaron las muestras por duplicado, con la presencia de un control positivo (anticuerpo anti-beta-lactoglobulina) y de un control negativo.

1.2 Resultados

Siguiendo el procedimiento anterior se determinó la presencia de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en sueros de niños sanos, diabéticos, celíacos y celíacos que estaban siguiendo el tratamiento.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de los niños, de los grupos anteriormente mencionados, que presentaban anticuerpos anti-beta-lactoglobulina. Se valoró la presencia de anticuerpos en niños sanos (285), niños diabéticos entre 1-14 años de edad y con menos de un año transcurrido desde el debut de la enfermedad (299), niños celíacos (227) y niños celíacos que seguían correctamente una dieta sin gluten (197). Como se puede observar el grupo de niños celíacos es el que presenta un porcentaje mayor de positividad frente al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina. Ese porcentaje revierte de un modo significativo cuando los niños celíacos siguen correctamente una dieta sin gluten.

Tabla 1

Porcentaje de niños sanos, diabéticos, celíacos y celíacos tratados positivos frente al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina

	Positivos	Negativos
Sanos (285)	4%	96%
Diabéticos (299)	43%	57%
Celíacos (227)	84%	16%
Celíacos tratados (197)	22%	78%

En la Figura 1 se indican los niveles de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina encontrados en los sueros de los niños sanos, diabéticos, celíacos y celíacos tratados. En dicha figura se puede observar que los niños celíacos presentan un nivel de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en suero 4 veces superior al de los niños sanos. Además, el nivel de anticuerpos en suero revierte hasta niveles iguales a los encontrados en los niños sanos positivos para el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, en el grupo de los niños celíacos que siguen correctamente la dieta libre de gluten.

EJEMPLO 2

Determinación de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en sueros de niños mediante tiras inmunocromatográficas

Uno de los procedimientos desarrollados en la presente invención se basa en unas tiras inmunocromatográficas de flujo lateral. Las tiras consisten en varias capas que aportan todo lo necesario.

La tira se trata en una prueba de dos bandas. Las tiras se introducen en placas de microtitulación que contienen en una dilución 1/20, 1/50 o 1/100, previamente preparada, del suero de los pacientes a estudiar, con una solución salina tamponadora a base de fosfatos (PBS) a pH y concentración salina fisiológica con un 1% de albúmina bovina (BSA). A poner la tira dentro de la muestra diluida, el líquido asciende por capilaridad y reconstituye unas microesferas coloreadas en rojo que se encontraban secas y recubiertas con beta-lactoglobulina purificada cromatográficamente a partir de leche bovina, si la muestra contiene anticuerpos frente a la beta-lactoglobulina. El complejo formado por las microesferas rojas coloreadas, la beta-lactoglobulina purificada cromatográficamente a partir de leche bovina y los anticuerpos anti-beta-lactoglobulina presentes en la muestra del paciente, asciende y alcanza una región que contiene una línea de beta-lactoglobulina purificada cromatográficamente a partir de leche bovina, provocando una inmunoreacción que da como resultado una línea roja. Esa banda roja indica la presencia de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, tipo IgA o IgG, en la muestra analizada. Como control del sistema, en la

5 región absorbente de la tira también están situadas otras microesferas secas coloreadas de azul y recubiertas con una proteína determinada. El complejo de las microesferas azules recubiertas de proteínas, reconstituidas, asciende por la tira hasta alcanzar una región en la que están fijados unos anticuerpos monoclonales frente a dicha proteína, reaccionando inmunológicamente y dando como resultado una banda azul. Cuando el suero no es inmunoreactivo solo se desarrolla una banda de control azul, mientras que en caso de inmunoreactividad, además de la banda azul, se desarrolla una banda de resultados roja pasados unos 5-10 min. En caso de no aparecer ninguna de las dos bandas el análisis no es válido y habría que repetirlo con una nueva tira. No se necesita equipamiento adicional para el desarrollo del ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico *in vitro* de celiaquía en un sujeto que comprende
- (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y
- 5 (ii) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (i) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;
- en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en la muestra de dicho sujeto mayor que el nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que dicho sujeto padece celiaquía.
- 10 2. Método *in vitro* de evaluación de la respuesta a una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende
- (i) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- 15 (ii) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- (iii) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (i) e (ii);
- 20 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ii) inferior al obtenido en (i) es indicativo de que la respuesta de dicho sujeto a la dieta libre de gluten es favorable.
- 25 3. Método *in vitro* de evaluación de la efectividad de una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiaquía que comprende
- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina antes del inicio de la dieta libre de gluten;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- 30 (iia) comparar los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) e (iia),
- en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al obtenido en (ia) es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva;
- o alternativamente,
- (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina al cabo de un periodo de tiempo transcurrido desde el inicio de la dieta libre de gluten; y
- 35 (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;
- 40 en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de que la dieta libre de gluten es efectiva.
4. Método *in vitro* de evaluación de la adherencia a una dieta libre de gluten por parte de un sujeto que padece celiaquía sometido a una dieta libre de gluten que comprende

- (ia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t1;
- (iia) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina a un tiempo t2, en donde t2 corresponde a un punto en el tiempo posterior a t1; y
- 5 (iiaa) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenidos en (ia) y (iia);
- en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (iia) inferior al valor obtenido en (ia) es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto;
- o, alternativamente,
- (ib) determinar en una muestra de sangre o de suero de dicho sujeto el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y
- 10 (iib) comparar el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) con el nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en una muestra de referencia;
- en donde un nivel de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina obtenido en (ib) inferior al nivel de dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina en dicha muestra de referencia es indicativo de adherencia a la dieta libre de gluten por parte de dicho sujeto.
- 15
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto tiene una dieta alimenticia que incluye leche y/o derivados lácteos.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha beta-lactoglobulina es una beta-lactoglobulina de un animal rumiante.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha beta-lactoglobulina es beta-lactoglobulina bovina.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha beta-lactoglobulina es beta-lactoglobulina de vaca.
- 25 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los niveles de anticuerpo anti-beta-lactoglobulina se determinan mediante un inmunoensayo, preferentemente un inmunoensayo tipo ELISA, un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral basado en el empleo de tiras inmunocromatográficas o un inmunoensayo basado en el empleo de inmunobiosensores.
10. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de referencia es una muestra de un sujeto, o conjunto de sujetos, diagnosticado como no celíaco.
- 30 11. Método según la reivindicación 3, en el que la muestra de referencia de la etapa (iib) es una muestra de un sujeto, o conjunto de sujetos, diagnosticado como no celíaco.
12. Método según la reivindicación 4, en el que la muestra de referencia de la etapa (iib) es una muestra de un sujeto, o conjunto de sujetos, diagnosticado como no celíaco.
13. Una tira inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos frente a beta-lactoglobulina, que comprende:
- 35 - una región de reacción, que comprende un primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, en donde dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es móvil y está embebido en un material poroso; y
- una región de test, que comprende un segundo componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina inmovilizado en dicha región de test;
- 40 en donde dicho primer y segundo componente de unión se seleccionan del grupo formado un antígeno específico para el anticuerpo anti-beta-lactoglobulina, o un fragmento de dicho antígeno con capacidad de unión a dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.
14. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 13, en la que dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina es beta-lactoglobulina o un fragmento de beta-lactoglobulina con capacidad de unión a dicho anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.
- 45

15. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 13, en la que dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está en forma seca o deshidratada.
16. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 13, en la que dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina está unido y/o recubriendo unas microesferas.
- 5 17. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 16, en la que dichas microesferas están coloreadas.
18. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 16, en la que dichas microesferas están en forma seca o deshidratada.
19. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 18, en la que dichas microesferas en forma seca o deshidratada se reconstituyen en contacto con la muestra.
- 10 20. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 13, que comprende, además, una región de recepción para recibir la muestra.
21. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 20, en la que dicha región de recepción se sitúa en la región de reacción que comprende el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.
- 15 22. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 20, en la que dicha región de recepción se sitúa en una región diferente de la región de reacción que comprende el primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.
23. Tira inmunocromatográfica según la reivindicación 13, que comprende:
- 20 a) unas primeras microesferas, coloreadas en un primer color, en forma seca o deshidratada y susceptibles de ser reconstituidas en contacto con la muestra a analizar, en donde dichas primeras microesferas están unidas a, o recubiertas total o parcialmente por un primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina; y
- 25 b) unas segundas microesferas, coloreadas en un segundo color, diferente a dicho primer color, opcionalmente, en forma seca o deshidratada y susceptibles de ser reconstituidas en contacto con la muestra a analizar, en donde dichas segundas microesferas están unidas a, o recubiertas total o parcialmente por una proteína-control, en donde dicha proteína-control es una proteína diferente a dicho primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina.
24. Un kit que comprende al menos una tira inmunocromatográfica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23.
- 30 25. Uso de un kit que comprende un primer componente de unión al anticuerpo anti-beta-lactoglobulina para
- diagnosticar celiacía en un sujeto; o para
 - evaluar la respuesta a una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiacía; o para
 - evaluar la efectividad de una dieta libre de gluten en un sujeto que padece celiacía; o para
 - 35 - evaluar la adherencia a una dieta libre de gluten por parte de un sujeto que padece celiacía sometido a una dieta libre de gluten.
26. Uso de un kit según la reivindicación 25, en el que dicho kit es un kit adecuado para un inmunoensayo tipo ELISA, o un kit adecuado para un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral basado.
27. Uso de un kit según la reivindicación 26, en el que dicho kit comprende una tira inmunocromatográfica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23.
- 40 28. Uso de un kit según la reivindicación 26, en el que dicho kit comprende un biosensor para la detección de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina.

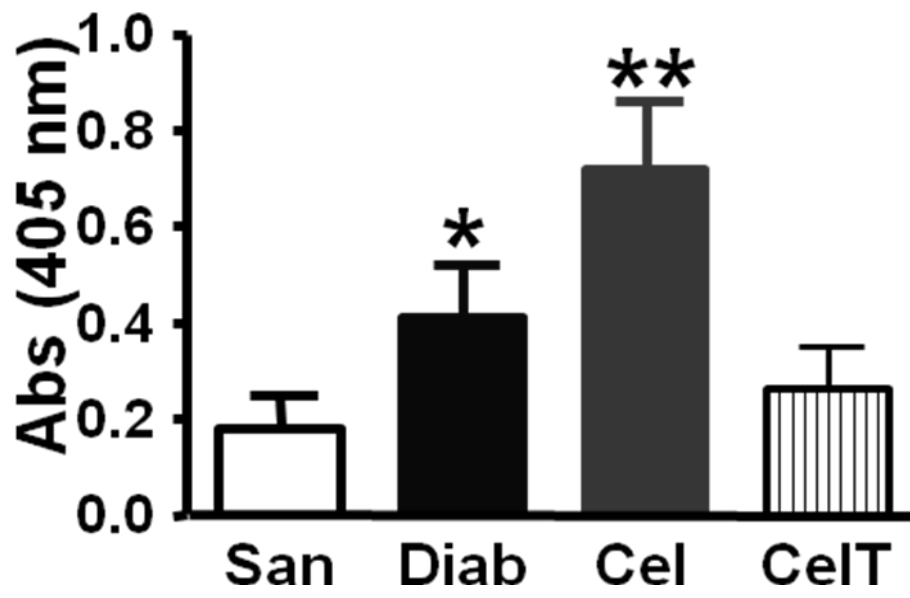


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201131979
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.12.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SAALMAN R <i>et al.</i> Avidity progression of dietary antibodies in healthy and coeliac children. Clinical and Experimental Immunology Nov 2003 VOL: 134 No: 2 Págs: 328-334 ISSN 0009-9104 (impreso) Doi: doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02296.x. Ver todo el documento, especialmente resumen y primer apartado de resultados.	1-28
X	SAALMAN R <i>et al.</i> Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to beta-lactoglobulin-coated cells with sera from children with intolerance of cow's milk protein. Clinical and experimental immunology Sept 1991 VOL: 85 No: 3 Págs: 446-452 ISSN 0009-9104 (impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen, segundo apartado de resultados y figura 2.	1-28
X	SCOTT H <i>et al.</i> Immune response patterns in coeliac disease. Serum antibodies to dietary antigens measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Clinical and experimental immunology Jul 1984 VOL: 57 No: 1 Págs: 25-32 ISSN 0009-9104 (impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen, segundo apartado de resultados, discusión, tabla 1 y figura 2.	1-28
X	SAALMAN R <i>et al.</i> ADCC-mediating capacity in children with cow's milk protein intolerance in relation to IgG subclass profile of serum antibodies to beta-lactoglobulin. Scandinavian journal of immunology Jul 1995 VOL: 42 No: 1 Págs: 140-146 ISSN 0300-9475 (impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen; página 143, columna derecha, párrafo 1; figura 2 y discusión.	1-28
X	ALARCON-SEGOVIA D <i>et al.</i> Presence of circulating antibodies to gluten and milk fractions in patients with nontropical sprue. AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Abril 1964 VOL: 36 No: 4 Pags: 485-499 ISSN 0002-9343 Doi: doi:10.1016/0002-9343(64)90098-1. Ver todo el documento.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.04.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

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

G01N, A61K

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

EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-28	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-28	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SAALMAN R <i>et al.</i> Clinical and Experimental Immunology Nov 2003 VOL: 134 No: 2 Págs: 328-334 ISSN 0009-9104 (impreso) Doi: doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02296.x.	11.2003
D02	SAALMAN R <i>et al.</i> Clinical and experimental immunology Sept 1991 VOL: 85 No: 3 Págs: 446-452 ISSN 0009-9104 (impreso).	09.1991
D03	SCOTT H <i>et al.</i> Clinical and experimental immunology. Jul 1984 VOL: 57 No: 1 Págs: 25-32 ISSN 0009-9104 (impreso).	07.1984
D04	SAALMAN R <i>et al.</i> Scandinavian journal of immunology Jul 1995 VOL: 42 No: 1 Págs: 140-146 ISSN 0300-9475 (impreso).	07.1995
D05	ALARCON-SEGOVIA D <i>et al.</i> AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Abril 1964 VOL: 36 No: 4 Págs: 485-499 ISSN 0002-9343 Doi: doi:10.1016/0002-9343(64)90098-1.	04.1964

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método de diagnóstico *in vitro* de celiaquía basado en la determinación de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en muestras de sangre o suero, y la comparación de los niveles obtenidos con los de una muestra de referencia, de modo que si los niveles de la muestra problema son más altos que los del control, el resultado es indicativo de que el sujeto padece celiaquía. La solicitud también reivindica, basándose en el mismo principio, varios métodos de evaluación (de la respuesta a una dieta libre en gluten en un sujeto que padece celiaquía, de la efectividad de una dieta libre en gluten en un sujeto que padece celiaquía y de la adherencia a una dieta libre en gluten por parte de un sujeto que padece celiaquía). Reivindica también una tira inmunocromatográfica para la detección de anticuerpos frente a beta-lactoglobulina, y el uso de un kit que contiene esa tira para los métodos reivindicados.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue los métodos de la solicitud tal y como están reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 28 de la solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986, de Patentes.

Se han encontrado documentos del estado de la técnica que describen el aumento de los niveles de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en la sangre de pacientes celíacos, y la disminución de esos niveles tras el seguimiento de una dieta libre en gluten. Por tanto, estos documentos –que se resumen a continuación- afectarán la actividad inventiva de los métodos de las reivindicaciones 1 a 12 de la solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes. Dado que el empleo de tiras inmunocromatográficas es ampliamente conocido en el campo técnico de la solicitud, su uso y el del kit que las contuviera resultarían evidentes para el experto en la materia una vez conocidos los métodos para los que se emplearían, por lo que estos mismos documentos afectarán también la actividad inventiva de las reivindicaciones 13 a 28 de la presente solicitud.

El documento D01 es un estudio de la avidéz de los anticuerpos frente a proteínas de la dieta (entre ellas, la beta-lactoglobulina) en niños sanos y celíacos. Entre otros resultados, se observó que los niveles de IgG frente a beta-lactoglobulina en suero de niños con celiaquía eran mayores que en niños sanos, y que los niveles de anticuerpo disminuían tras seguir una dieta libre de gluten (ver, por ejemplo, el segundo párrafo del apartado de resultados, en la página 330, columna izquierda, párrafo 3). Por tanto, las reivindicaciones 1 a 28 de la presente solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el documento D01.

En los demás documentos citados en este informe (documentos D02 a D05) se describe igualmente un aumento de la cantidad de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina en suero de pacientes de celiaquía. En el documento D02 se muestran los elevados niveles de IgG y de IgA en el grupo de pacientes de celiaquía no tratados (por ejemplo, en la página 449, columna derecha, párrafos 3 y 4; o en la página 450, columna izquierda, párrafo 4). Los datos obtenidos en el documento D03 indican también un aumento en la cantidad de varias inmunoglobulinas séricas frente a beta-lactoglobulina en pacientes celíacos (ver tabla 1, o figura 2). En el documento D04, que consiste en un estudio de intolerancia a proteínas de leche de vaca, se miden también los niveles de anticuerpos IgG anti-beta-lactoglobulina en niños celíacos y sanos, y se observa que los niños con celiaquía tienen altos niveles de estos anticuerpos. Por último, en el documento D05 se muestra también que los anticuerpos circulantes frente a beta-lactoglobulina aumentan en pacientes diagnosticados de celiaquía.

Por todo lo anteriormente expuesto, se concluye que la información divulgada en cada uno de estos 5 documentos afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 28 de la solicitud que, por tanto, no cumple el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes.