

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 544**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08706848 .2**
96 Fecha de presentación: **28.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2126582**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN FLUIDOS CORPORALES MEDIANTE UNA REACCIÓN INMUNITARIA CON GLICOPROTEÍNA 2 (GP2) DE GRÁNULOS DE ZIMOGENO DEL PÁNCREAS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS DEL INTESTINO Y PANCREATITIS CRÓNICA.**

30 Prioridad:
26.01.2007 EP 07090010
26.01.2007 DE 102007004909

73 Titular/es:
GA GENERIC ASSAYS GMBH
LUDWIG-ERHARD-RING 3
15827 DAHLEWITZ, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

72 Inventor/es:
ROGGENBUCK, Dirk

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 544 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de anticuerpos en fluidos corporales mediante una reacción inmunitaria con glicoproteína 2 (GP2) de gránulos de zimógeno del páncreas para el diagnóstico diferencial de enfermedades inflamatorias del intestino y pancreatitis crónica

5 La invención se refiere a un procedimiento para la detección de anticuerpos en heces y/o fluidos corporales mediante una reacción inmunitaria con GP2 de gránulos de zimógeno del páncreas o sus secuencias inmunorreactivas

El procedimiento puede servir para el diagnóstico o el control terapéutico de enfermedades, que van acompañadas de una reacción inmunitaria contra GP 2 y sus sustancias análogas. Por tanto es objeto de la invención el uso de GP2, o sus secuencias inmunorreactivas para el diagnóstico o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino crónicas, seleccionadas del grupo que comprende enfermedad de Crohn (EC), pancreatitis crónica (PC), y colitis ulcerosa (CU).

La presente invención se apoya en el conocimiento de que GP2 es un autoantígeno de procesos inmunitarios en enfermedades inflamatorias del intestino (EII), preferentemente en EC y PC y por tanto un epítipo de los anticuerpos asociados con la enfermedad.

GP2 es una glicoproteína de membrana de células acinares del páncreas con un peso molecular aparente de 78 kD. Además se detectó GP2 en los enterocitos del intestino y también como componente de lisosomas o como péptido libre, no unido a la membrana, en el jugo pancreático. Representa con el 30-45 % de la proteína de membrana total, el componente principal de la membrana de gránulos de zimógeno. Junto con otras proteínas pancreáticas secretoras de los gránulos de zimógeno tales como sincolina, lectina ZG16p, sinaptobrevina 2 y diferentes proteoglicanos de matriz de sulfato GP2 es un componente de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) de la membrana de gránulos, en la que sincolina interacciona con GP2. Estos complejos, a los que pueden pertenecer aún otras proteínas tales como ZG46p, forman la matriz submembranosa.

A través de un anclaje de fosfatidilinositol, GP2 está unida a la membrana de los gránulos zimógenos de las células acinares del páncreas y puede desprenderse por ejemplo mediante fosfolipasa C de *B. cereus*. Los gránulos zimógenos son cámaras de reserva de enzimas digestivas tales como por ejemplo amilasa en las células acinares del páncreas. Tras la estimulación neuronal u hormonal de las células acinares se secretan las enzimas digestivas a los conductos pancreáticos. Además de la localización de GP2 en la membrana de gránulos zimógenos, se encuentra también en la matriz, en el aparato de Golgi así como en el jugo pancreático en las luces de los acinos. Además existen indicaciones de que GP2 es un componente de los lisosomas y por consiguiente participa en la endocitosis.

Durante la estimulación de la secreción pancreática, GP2 se transporta hacia la superficie de membrana apical de las células acinares, se desprende y se libera en la luz acinar. Debido a la cantidad relativamente grande de GP2 en el jugo pancreático se especula que existe un conjunto celular adicional, a partir del cual puede secretarse GP2. En contraposición a las enzimas digestivas, que se activan mediante proteólisis en el intestino, GP2 se modifica ya en la célula acinar mediante ruptura. Se supone que la proteólisis secuencial intracelular de la GP2 influye en su función.

Dado que los niveles en suero de GP2 son elevados en caso de pancreatitis crónica y aguda, se discute la idoneidad de GP2 como marcador para el diagnóstico serológico de estas entidades. En un modelo de rata pudo demostrarse que la concentración en suero de GP2 está correlacionada con el grado de gravedad de las enfermedades inflamatorias del intestino.

Para las líneas celulares de ser humano no ha podido demostrarse hasta el momento de manera incuestionable esta relación de que los niveles de GP2 detectables a través de los autoanticuerpos presentan una variabilidad individual considerable.

A pesar de esta desventaja, una serie de planteamientos para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico se basa en la producción y detección de los anticuerpos, que están dirigidos frente a GP2, para, con ayuda de la reacción con los anticuerpos, determinar el grado de gravedad de enfermedades inflamatorias del intestino.

Entre las enfermedades inflamatorias del intestino EC y colitis ulcerosa (CU) representan las dos más importantes. Se caracterizan por procesos inflamatorios crónicos, recurrentes, que destruyen los tejidos en el sistema digestivo. La etiología y patogénesis de la EC así como de la CU quedan aún por esclarecer.

Mientras que en el caso de la CU la inflamación aparece sobre todo en la mucosa y submucosa del colon y del recto, en el caso de la EC son característicos procesos de inflamación granulomatosa, que intervienen en la pared de todo el tracto gastrointestinal.

Factores genéticos así como ambientales parecen desempeñar un papel decisivo en la formación de EII. La relación entre las mutaciones en el gen NOD2 y la aparición de la EC ha de considerarse garantizada en varias cohortes. Asimismo existe una asociación clara para la aparición de la EC en el íleo terminal. Hasta el momento no ha podido

establecerse una relación entre los marcadores genéticos y el desarrollo de la terapia para ningún procedimiento de tratamiento (incluyendo la terapia anti-TNF).

La incidencia de EC en Europa se encuentra en 5,6 por 100.000 al año. La prevalencia de EC en Alemania se indica con 1/500 a 1/800.

5 Los primeros síntomas de enfermedad de EC aparecen de media relativamente temprano a los 30 años. Por consiguiente, los pacientes con EC ven afectada su vida profesional, lo que acarrea efectos socioeconómicos correspondientes. De manera similar al caso de la CU, en el caso de pacientes con EC con colitis de Crohn y un transcurso de muchos años, la incidencia de carcinoma es elevada.

10 Las quejas comprenden dolores abdominales, diarrea, malabsorción, abscesos, fístulas, complicaciones por cálculos biliares, cálculos renales y sus complicaciones.

15 Los pacientes con EC pueden presentar una serie de manifestaciones extraintestinales, apareciendo la pancreatitis con un 3,5 % relativamente pocas veces en pacientes con EC. Una hiperamilasemia e hiperlipasemia sin síntomas de una pancreatitis aguda puede observarse sin embargo en el 8-17 % de los pacientes, lo que indica una mayor tasa de pancreatitis silenciosa. Las modificaciones en el conducto pancreático son aisladas y se han descrito reducciones de la función pancreática. La elevación de la hiperamilasemia e hiperlipasemia está correlacionada con la actividad de la EC. En un 4,6 % de los pacientes con EC se encuentran al mismo tiempo modificaciones en los conductos pancreáticos y biliares de manera similar al caso de los pacientes con colangitis esclerosante primaria. No obstante, la pancreatitis crónica en pacientes con EC se diferencia en general de aquélla en el caso de CU, que con mayor frecuencia presenta una implicación de los conductos biliares, pérdida de peso y estenosis de los conductos biliares. Se discute la existencia de una pancreatitis crónica idiopática, que está asociada con la EC. A diferencia de la pancreatitis crónica asociada con CU, en el caso de pacientes con EC los síntomas intestinales aparecen con mayor frecuencia antes de la aparición de hallazgos pancreáticos. La frecuente insuficiencia pancreática exocrina en la EC puede atribuirse fácilmente a la pronunciada degeneración acinar, que va acompañada de densos infiltrados inflamatorios en el parénquima.

25 Como terapia se recomienda la administración de ácido 5-aminosalicílico, aunque diferentes estudios han llamado la atención sobre desventajas notables, dado que con este principio activo sólo se conseguían efectos limitados o ningún efecto. La aplicación surge sin embargo en pacientes con un brote de gravedad de ligera a moderada debido a los datos existentes de manera absolutamente justificada, cuando en caso de ineficacia se inicia a tiempo un cambio de terapia. En el caso de un brote grave sin complicaciones ha tomarse en consideración la administración de equivalentes de prednisolona. Si se producen brotes frecuentes ($\geq 2/\text{año}$), puede administrarse adicionalmente azatioprina o 6-mercaptopurina.

30 Los costes totales de un paciente con EC en Alemania se calculan en 20.000 euros por año y caso. Las aplicaciones para pacientes con EC incluyendo los costes indirectos en Alemania se elevan 2 mil millones de euros calculados, en los EE.UU. se indican para ambas EII 2,6 mil millones de dólares estadounidenses como costes socioeconómicos.

35 Los preparados de anticuerpos anti-TNFalfa son eficaces en la EC e inducen la remisión de la enfermedad crónica. No obstante, en estos preparados son desventajosos los efectos secundarios, por lo que su uso se tiene en cuenta solamente como medicamento de reserva en función de la situación clínica. Únicamente pacientes con EC con espondiloartropatía activa como complicación extraintestinal parecen sacar provecho de una terapia con anticuerpos anti-TNFalfa en cuanto a ambos cuadros clínicos.

40 Para una terapia adecuada y un control de la evolución de estos pacientes es necesaria una posición clara de diagnóstico. A este respecto, una desventaja considerable es no obstante, que hasta el momento no existe ninguna prueba unívoca, y por tanto debe recurrirse a un diagnóstico clínico de la EC, que incluye como constituyente esencial biopsias de segmentos de ileocolonoscopia, que también están indicadas antes de operaciones intestinales selectivas. Sin embargo, por lo general no es necesaria en el transcurso en el caso de sintomatología aguda o antes de una nueva terapia antiinflamatoria. En el diagnóstico primario debería hacerse un diagnóstico por endoscopia superior en cada paciente.

45 En el contexto del diagnóstico, exámenes histológicos caros y costosos en comparación de biopsias de mucosas constituyen una componente importante adicional. Para ello se extraen biopsias sobre todo de zonas macroscópicamente llamativas y no llamativas. Para poder aprovechar de manera eficaz las posibilidades del diagnóstico diferencial histopatológico, las biopsias deben no obstante extraerse de al menos cinco segmentos anatómicos distintos de todo el colon incluyendo el recto, del íleo terminal y del tracto gastrointestinal superior.

50 El ultrasonido transabdominal como procedimiento de formación de imágenes sirve como procedimiento sensible para la detección de modificaciones inflamatorias en la pared intestinal y la detección de abscesos, fístulas y estenosis en pacientes con EC. Un flujo sanguíneo elevado detectable tanto en las arterias mesentéricas como en la pared intestinal está asociado con la presencia de inflamación aguda. El ultrasonido endorrectal y la tomografía por resonancia magnética (TRM) de la pelvis pequeña se reconocen como procedimientos de igual sensibilidad para el diagnóstico y la clasificación de abscesos y fístulas anorrectales.

5 Dado que no existe ninguna prueba unívoca, deben considerarse una serie de parámetros para el diagnóstico de laboratorio de la EC. La determinación de la proteína C reactiva (CRP), trombocitos, hemoglobina (Hb)/hematocrito así como leucocitos representa en este sentido el diagnóstico de base. Se recurre a otros parámetros tales como el hemograma diferencial y la albúmina como complemento. En la fase aguda de la EC, los parámetros mencionados anteriormente tales como CRP y el recuento leucocitario así como las proteínas de fase aguda en el caso de muchos pacientes están elevados y se recomiendan también para el control de la evolución.

En la fase aguda se produce un aumento de la permeabilidad intestinal, el aclaramiento de alfa-1-antitripsina y la eliminación de calprotectina en las heces.

10 La obtención de datos clínicos e histológicos no permite, sin embargo, ninguna diferencia clara de EC y CU. Esta desventaja conduce con frecuencia a la definición de una colitis indeterminada (CI). Además las infecciones intestinales así como también las enfermedades funcionales pueden desarrollar síntomas similares y dificultar considerablemente el diagnóstico diferencial. En el caso del 10 al 15 % de los pacientes con EII la clasificación en CD o EC por los datos de biopsia y un determinado solapamiento de los síntomas clínicos en la región del colon es extraordinariamente difícil. Pacientes con CI parecen presentar con mayor frecuencia complicaciones a largo plazo e insuficiencias por anastomosis tras intervenciones quirúrgicas que los pacientes con CU. La diferencia de si los

15 pacientes con CI según el pronóstico se desarrollan en la dirección de una EC o de una CU, tiene sin embargo una influencia significativa sobre el pronóstico y la evolución de la enfermedad así como la elección de la terapia medicamentosa y el momento de la intervención quirúrgica. En el transcurso de la enfermedad, con frecuencia una clasificación puede realizarse más tarde sólo basándose en datos clínicos adicionales. La diferencia de EC y CU es por ejemplo el fundamento para la decisión, de si puede tomarse en consideración en el paciente una anastomosis con bolsa ileoanal. Para pacientes con EC con ataque principalmente del intestino grueso (colitis de Crohn) esta intervención quirúrgica está indicada sólo en muy raros casos, mientras que en el caso de la CU este método está indicado más frecuentemente. Los pacientes con EC presentan una tasa claramente elevada de insuficiencias por anastomosis, de modo que debe reflexionarse detenidamente sobre cualquier intervención quirúrgica.

25 En el contexto del diagnóstico diferencial de EII se ha descrito una serie de anticuerpos que reaccionan con antígenos propios del organismo y de alimentos. La prueba de estos anticuerpos es que no parecen desempeñar ningún papel patogénico y no reproducen la actividad de la enfermedad. A pesar de ello el diagnóstico serológico de anticuerpos se aprovecha como ayuda decisiva en la posición de diagnóstico y, sobre todo en el caso de la colitis indeterminada es un fundamento para decidir la terapia.

30 Se describieron autoanticuerpos contra proteínas del citoesqueleto en pacientes con EC confirmada por medio de biopsia (Mayet *et al.*, 1990). Entre otros se hallaron autoanticuerpos frente a citoqueratina 18, actina, vimentina, desmina y tropomiosina. Aunque los autoanticuerpos frente a citoqueratina 18 presentan una correlación con la actividad de la enfermedad, no se han introducido en el diagnóstico de rutina de EII probablemente debido a la baja especificidad.

35 Para pacientes con EC se han identificado como patognomónicos autoanticuerpos frente a tejido de páncreas exocrino (PAK) y anticuerpos frente a manano de *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (Stöcker *et al.*, 1987; Main *et al.*, 1988). Se hallan autoanticuerpos frente a granulocitos neutrófilos humanos (ANCA) y células calciformes (BAK) preferentemente en pacientes con CU.

40 La determinación de PAK, ANCA y ASCA para establecer el diagnóstico en el caso de CI se valora como de gran ayuda.

Los autoanticuerpos específicos de EII frente a tejido pancreático, células calciformes y granulocitos neutrófilos humanos se determinan hoy en día sin embargo todavía con ayuda de la técnica de inmunofluorescencia (IFT) debido a los autoantígenos no conocidos, responsables de la reacción inmunitaria. Así, por medio de esta técnica,

45 en el 27-39 % de los pacientes con EC se hallaron autoanticuerpos frente a antígenos pancreáticos. Más de la mitad de los pacientes con EC (68 %) con complicaciones extraintestinales pueden presentar PAK. En la práctica esta técnica ha demostrado ser en cambio desventajosa, dado que no puede automatizarse y por tanto es cara y requiere mucho tiempo.

Asimismo, para la EC se detectan por el contrario de forma intensificada ASCA específicos en el ensayo inmunoenzimático (EIA), dado que este método es menos subjetivo en la valoración y puede automatizarse.

50 Hoy en día, las determinaciones de anticuerpos individuales se consideran insensibles para el diagnóstico serológico de la EC. La combinación de distintas especificidades de anticuerpos puede mejorar extraordinariamente la sensibilidad o especificidad de diagnóstico para el diagnóstico diferencial de EII y permitir un pronóstico para CI.

Para la combinación de parámetros es muy ventajosa una plataforma tecnológica común tal como la del EIA. Esto supone el conocimiento del autoantígeno de las PAK, que lo reconocen de manera específica las PAK en las

55 secciones de tejido pancreático de diferentes especies.

En el pasado se han facilitado distintos planteamientos para la identificación de los autoantígenos en el caso de la EC, estando los antígenos pancreáticos en el centro de interés debido a la elevada sensibilidad relativa ya

- mencionada de las PAK. Se detectaron PAK por medio de secciones de tejido de diferentes especies (ser humano, rata, mono) en la IFT. Esto permite señalar, en cuanto a la filogenia, a epítomos conservados, que son reconocidos por las PAK. Fricke *et al.* Describen un complejo de proteína que consiste en varias subunidades que reaccionan con PAK con un peso molecular (MW) superior a 800 kDa (Fricke *et al.*, 1999). Sin embargo los autores no pudieron secuenciar la proteína correspondiente ni las subunidades reactivas con PAC en la inmunotransferencia con los MW 5 16, 18, 19, 24, 27, 29, 31 y 34 kDa y por tanto no pudieron identificarlas. Se supuso que la proteína reconocida por PAK parece ser un complejo de proteína con varios subgrupos. Debido a experimentos de inhibición con distintas glicoproteínas se descartó una reactividad de las PAK con cadenas de hidratos de carbono de los autoantígenos putativos.
- 10 Seibold *et al.* describen la reactividad de PAK frente a un antígeno macromolecular purificado a partir del jugo pancreático con un MW superior a 10^6 Da (1000 kDa), que tras un tratamiento con tripsina perdió su reactividad frente a PAK. En el ELISA con distintas proteínas pancreáticas tales como amilasa, lipasa, fosfolipasa A y C, enterocinasa, carboxipeptidasa A y B, quimiotripsina A y B, quimiotripsinógeno, elastasa, tripsina, inhibidor de tripsina, lactoferrina y calicreína no pudo comprobarse ninguna reactividad con PAK.
- 15 Aunque el nivel de GP2 y el grado de enfermedad de EII según algunos autores están correlacionados entre sí, se desconoce la relación fisiológica. En un modelo de ratón deficiente pudo mostrarse que la presencia de GP2 no es esencial ni para la secreción del páncreas exocrino ni para la formación gránulos de zimógeno. Además tampoco está clara la función fisiológica de las dos isoformas conocidas de GP2 (Fukuoka, 2000). Además de una isoforma corta con una longitud de 380 aminoácidos, β -GP2, existe una α -GP2 de 530 aminoácidos de longitud. Ambas 20 isoformas del péptido pueden detectarse, entre otros, en el tejido del páncreas humano, apareciendo la isoforma pequeña β -GP2 en títulos considerablemente mayores que la isoforma grande α -GP2. También una detección de los transcritos de ambas formas en el tejido del páncreas muestra una expresión más intensa de β -GP2 que de α -GP2.
- El papel de las distintas isoformas no está aclarado. Los péptidos, cuyas secuencias presentan similitudes elevadas con la isoforma grande α -GP2 serán responsables de la formación de tumores pancreáticos. Los anticuerpos frente 25 a GP2 como analito y marcador se usarán para el diagnóstico de cáncer de páncreas y el péptido y su secuencia de ácido nucleico para la inmunoterapia enfermedades cancerosas del páncreas (documento WO 01/94409). Los anticuerpos frente a la isoforma pequeña β -GP2 se usan como marcadores para la pancreatitis (documento WO 96/17873). El aumento de la concentración de β -GP2 detectará la enfermedad.
- Se advirtió expresamente la necesidad de la identificación aún pendiente del (de los) autoantígenos(s) del páncreas, 30 para esclarecer la importancia de los proceso autoinmunitarios en la patogenia de la EC y respaldar la discriminación de casos de EII no claros por un diagnóstico de laborarlo correspondiente.
- En el estado de la técnica se conocen ensayos, en los que por medio de presentación en fago aleatorizada podían obtenerse bibliotecas de péptidos que se usaban para la determinación de anticuerpos específicos de la EC. Se 35 determinaron 4 números distintos, que con el uso en un EIA detectaron como positivos el 56,5 % de los sueros de los pacientes con EC. Los grupos control (CU, úlcera duodenal, sano) no reaccionaron o sólo reaccionaron en el 6 % de los casos. Debido a las secuencias peptídicas conocidas de los nanómeros, no pudo sacarse sin embargo ninguna conclusión sobre el o los autoantígeno(s) nativo(s) de la EC.
- Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado identificar el (los) antígeno(s) pancreático(s) correspondiente(s) 40 (Bossuyt, 2006). Por consiguiente, hasta hoy no existe ninguna detección no invasiva, específica, cuantitativa, que realizable fácilmente y de manera económica para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn y la pancreatitis crónica así como su discriminación con respecto a la colitis ulcerosa.
- Este problema se soluciona mediante la invención. Basándose en la caracterización sorprendente de GP2 como autoantígeno para la EC y la pancreatitis crónica asociada, se desarrolló un procedimiento con el uso de GP2 según 45 las reivindicaciones para el diagnóstico o el control terapéutico de EII, desprendiéndose formas de realización ventajosas de la invención de las reivindicaciones dependientes.
- La invención se refiere por consiguiente a un procedimiento para la detección de anticuerpos en heces y/o fluidos corporales especialmente sangre y/o suero para el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades 50 inflamatorias del intestino, seleccionadas del grupo que comprende enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa, mediante una reacción inmunitaria con GP2 según la SEQ ID NO. 1, o una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos, que presenta una homología con la SEQ ID NO. 1, ascendiendo la homología al menos al 80 %, preferiblemente al 90 %, comprendiendo la reacción inmunitaria una unión de un anticuerpo a un antígeno y siendo GP2 según la SEQ ID NO. 1 el antígeno. La SEQ ID NO. 1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

10 20 30 40 50 60
 MVGSGLLWLA LVSCILTQAS AVQRGYGNPI EASSYGLDL D CGAPGTPEAH VCFDPCQNYT
 70 80 90 100 110 120
 LLDEPFRSTE NSAGSQGCDK NMSGWYRFVG EGGVRMSETC VQVHRCQTDA PMWLNTHPA
 130 140 150 160 170 180
 LGDGITNHTA CAHWSGNCCF WKTEVLVKAC PGGYHVYRLE GTPWCNLRYS TDPSTVEDKC
 190 200 210 220 230 240
 EKACRPEEEC LALNSTWGCF CRQDLNSSDV HSLQPQLDCG PREIKVKVDK CLLGGLGLGE
 250 260 270 280 290 300
 EVIAYLRDPN CSSILQTEER NWVSVTSPVQ ASACRNILER NQTHAIYKNT LSLVNDFIIR
 310 320 330 340 350 360
 DTILNINFQC AYPLDMKVS L QAALQPIVSS LNVSDGNGE FIVRMALFQD QNYTNPYEGD
 370 380 390 400 410 420
 AVELSVESVL YVGAILEQGD TSRFNVLVRN CYATPTEDKA DLVKYFIIRN SCSNQRDSTI
 430 440 450 460 470 480
 HVEENGQSS E SRFVQMFMF AGHYDLVFLH CEIHLCDSLN EQCQPSCSR S QVRSEVPAID
 490 500 510 520
 LARVLDLGP I TRRGAQSPGV MNGTPSTAGF LVAWPMVLLT VLLAWLF

Como fluidos corporales se definen además según la invención sangre, suero, orina, jugos pancreáticos puros o jugos duodenales humanos.

- 5 La determinación de autoanticuerpos frente a GP2 o su uso en un ELISA como antígenos de fase sólida para el diagnóstico serológico de la EC o de la pancreatitis crónica no se ha tomado en consideración ni se ha mencionado en el estado de la técnica.

Objeto de la invención es la enseñanza sorprendente de que GP2, especialmente según la secuencia SEQ ID NO. 1 puede usarse para la detección de las enfermedades inflamatorias del intestino enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y colitis ulcerosa.

- 10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento, en el que se detectan anticuerpos IgA, IgM y/o IgG humanos de enfermedades autoinmunitarias.

En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención la GP2 es de origen humano, animal, recombinante o sintético. Dado que GP2 representa un péptido altamente conservado, para la detección puede usarse de manera ventajosa GP2 de cualquier origen, siempre que la secuencia sea análoga en cuanto a la función a la secuencia según la invención. La elevada afinidad de unión entre GP2 como antígeno y los autoanticuerpos se mantiene.

- 15

En una forma de realización preferida adicional del procedimiento según la invención tiene lugar la detección de los autoanticuerpos en un inmunoensayo, preferiblemente con acoplamiento directo o indirecto de un componente de reacción con una sustancia de marcado. Esto permite la adaptación flexible del procedimiento a las posibilidades y requisitos de distintos trabajos y su equipo de diagnóstico de laboratorio.

- 20

En una forma de realización ventajosa tiene lugar la detección de los anticuerpos específicos de EII en un inmunoensayo, encontrándose los anticuerpos disueltos en una fase líquida, preferiblemente diluidos en una solución tampón habitual conocida para el experto o en fluido corporal no diluido. Además la detección según la invención puede tener lugar también en muestras de heces.

- 25

En una forma de realización ventajosa adicional el inmunoensayo sirve para la detección de anticuerpos y prevé la unión del antígeno GP2 según la SEQ ID NO. 1 a una fase sólida. Tras la adición de la solución de muestra el

anticuerpo contenido en la misma de un paciente se une al antígeno GP2. El anticuerpo unido a GP2, que procede por ejemplo del suero o las heces de un paciente, se detecta a continuación mediante un reactivo marcado y opcionalmente se cuantifica. Dices procedimiento, mediante el cual se une el antígeno a la fase sólida, es conocido por el experto como ensayo directo (*Direct Assay*).

5 Según la invención tiene lugar la detección de los anticuerpos en este procedimiento es decir mediante el uso de reactivos marcados según tecnología de ELISA conocida (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzimas-linked Immunosorbent Assay*)). Los marcajes según la invención comprenden por tanto enzimas que catalizan una reacción química, que pueden determinarse ópticamente, especialmente mediante sustratos cromógenos, procedimientos de quimioluminiscencia o colorantes de fluorescencia.

10 En una forma de realización preferida adicional tiene lugar la detección de los autoanticuerpos mediante el marcaje con sustancias débilmente radioactivas en radioinmunoanálisis (RIA), midiéndose la radioactividad que aparece.

15 En una forma de realización preferida adicional de la invención se usan moléculas GP2 unidas a la fase sólida o solubles para la unión de anticuerpos. En una segunda etapa de reacción se inmunoglobulinas anti-ser humano, preferiblemente seleccionadas del grupo que comprende anticuerpos IgA anti-ser humano, IgM anti-ser humano y/o IgG anti-ser humano, tratándose en el caso de las inmunoglobulinas anti-ser humano de conjugados marcados detectables de dos componentes, que pueden conjugarse con todas las enzimas de marcaje habituales, especialmente sustratos cromógenos y/o quimioluminiscentes, preferiblemente con: - peroxidasa del rábano - fosfatasa alcalina. La ventaja de esta forma de realización es el uso de tecnología de ELISA presente habitualmente en operaciones de laboratorio, de modo que la detección según la invención puede establecerse de forma económica.

20 En una forma de realización preferida adicional de la invención, el anticuerpo unido a GP2 con inmunoglobulinas anti-ser humano, preferiblemente seleccionadas del grupo que comprende anticuerpos IgA anti-ser humano, IgM anti-ser humano y/o IgG anti-ser humano, que se acoplan a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Al igual que la prueba de ELISA mencionada anteriormente, la tecnología de FITC representa también un sistema de modo que está establecido en muchos sitios y por tanto permite un establecimiento sin dificultades y económico de la detección según la invención en la rutina de laboratorio.

25 En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención mencionado anteriormente, GP2 según la SEQ ID NO. 1 reconoce autoanticuerpos dirigidos frente a tejido intestinal. Esta forma de realización tiene el efecto ventajoso de que el diagnóstico de EII para los pacientes puede tener lugar sin intervenciones a menudo onerosas de fluidos corporales o heces.

30 En una forma de realización preferida adicional de la invención, la GP2 según la SEQ NO. 1 está unida a una fase sólida. La unión de la GP2 según la SEQ NO. 1 a la fase sólida puede tener lugar a través de un espaciador. Como espaciador pueden usarse todos los compuestos químicos que para la función del espaciador presentan los requisitos estructurales y funcionales adecuados, siempre que éstos no modifiquen el comportamiento de unión de tal manera que se ve afectada una unión del autoanticuerpo con GP2 según la SEQ NO. 1 de forma desventajosa.

35 Los procedimientos y usos según la invención posibilitan el diagnóstico o el control terapéutico de la enfermedad de Crohn, porque sorprendentemente es posible con el antígeno GP2 preferentemente según la SEQ NO. 1, detectar autoanticuerpos en heces y/o fluidos corporales, especialmente sangre y/o suero mediante una reacción inmunitaria con GP2, sus secuencias inmunorreactivas o análogos, no realizándose esta reacción inmunitaria con una sección de tejido de un tejido animal o humano.

40 En una variante de realización preferida del procedimiento de detección descrito, el autoanticuerpo se detecta preferiblemente con el uso de acoplamiento directo o indirecto de un componente de reacción con una sustancia de marcado.

45 Según la invención, la realización del procedimiento de detección descrito es en una fase sólida, aumentado la unión sorprendentemente estable del antígeno GP2 a la fase sólida de manera ventajosa la vida útil de almacenamiento del péptido.

50 Objeto de la invención es además el uso de la molécula GP2 según la secuencia SEQ ID NO. 1 para la producción de un medicamento para su aplicación en el diagnóstico y/o el control de terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino. En la práctica, este uso según la invención tiene el efecto ventajoso de que puede renunciarse a menudo a procedimientos costosos e inseguros, que se apoyan por ejemplo en biopsias, diagnóstico de laboratorio e intervenciones clínicas, o pueden adoptarse de manera claramente optimizada las medidas debido a la detección existente. GP2 representa en este sentido un péptido suficientemente estable y reabsorbible, de modo que puede administrarse a los pacientes como medicamento incluso en forma oral.

55 En la invención la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa. Hasta ahora estas enfermedades podían detectarse o diferenciarse entre sí sólo difícilmente o con un esfuerzo enorme. Mediante esta forma de realización preferente es ahora posible detectar de manera sencilla la enfermedad de Crohn y la pancreatitis crónica e incluso diferenciarlas de la colitis ulcerosa por el camino del

diagnóstico diferencial.

La enfermedad de Crohn pertenece al grupo de las enfermedades inflamatorias del intestino crónicas. Se trata de una inflamación presuntamente autoagresiva, granulomatosa crónica, que puede aparecer en todo el tracto gastrointestinal desde la cavidad oral hasta el ano. Preferentemente se ven atacados el intestino delgado inferior (íleo terminal, ataque en aproximadamente el 40 %) y el colon, más raramente, esófago y boca. Para la enfermedad de Crohn es caracterizador el ataque segmentario discontinuo (denominado "skip lesions") de la mucosa intestinal, es decir pueden estar enfermas al mismo tiempo varias secciones intestinales que están separadas entre sí por secciones sanas. Otros nombres para la enfermedad son enteritis regional de Crohn, ileitis terminal, enterocolitis regional y enteritis crónica esclerosante, o las abreviaturas EC, CD (*Crohn's Disease*) y en general como IBD (*Inflammatory Bowel Disease*). La enfermedad de Crohn en el sentido de la invención es por consiguiente el estado que puede caracterizarse macroscópicamente por las siguientes modificaciones:

- Fenómenos de manguera de jardín: por estenosis segmentaria provocada por fibrosis
- Fenómenos de adoquinado: mucosa inflamada se alterna con ulceraciones profundas, apareciendo un aspecto de adoquinado.
- Conglomerado tumoral inflamatorio: distintas secciones intestinales se pegan entre sí.

Desde el punto de vista histológico se reconoce sobre todo una acumulación de linfocitos, granulocitos (eosinófilos) e histiocitos en la biopsia del tejido intestinal inflamado. Los ganglios linfáticos colindantes están en la mayoría de los casos agrandados. Con frecuencia se forman granulomas que pueden diferenciarse en dos tipos: granulomas de células epitelioides y microgranulomas (de menor tamaño y sin necrosis central).

La enfermedad de Crohn en el sentido de la invención puede caracterizarse también mediante diagnóstico. En este caso la enfermedad de Crohn en el sentido de la invención es un estado en el que pueden detectarse al menos una de las siguientes características:

- Apendicitis: en la mayoría de los casos un dolor que se desarrolla rápidamente en la parte inferior derecha del vientre. Con frecuencia una diferencia de temperatura $> 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre la medición rectal y axial.
- Diverticulitis: resistencias palpables en el dolor de la parte inferior del vientre en la mayoría de los casos al lado izquierdo.
- Yersiniosis: detección del agente causal en las heces o en el material de biopsia, ascenso de los títulos de anticuerpos.
- Tuberculosis intestinal: en Europa Central por ahora muy rara. La tuberculosis intestinal va acompañada con frecuencia de implicación de los pulmones. Se encuentran granulomas de células epitelioides "caseificante" en el material de biopsia.
- Cualquier otra colitis infecciosa invasiva (enteritis debida a Salmonella, colitis pseudomembranosa etc.)

La pancreatitis en el sentido de la invención es una inflamación del páncreas que puede transcurrir de manera aguda o crónica.

En la mayoría de los casos la pancreatitis aparece por una activación de las enzimas pancreáticas dentro del órgano. Dado que la tarea de estas enzimas es digerir proteínas y grasa, comienza una autodigestión del órgano. Esta autodigestión conduce a la inflamación del páncreas. En casos graves pueden aparecer hemorragias, daños tisulares grave, infecciones y quistes. Una glándula inflamada puede conducir a que las enzimas entren en el torrente circulatorio y alcancen así los pulmones, el corazón y los riñones, donde pueden aparecer otros daños. La pancreatitis aguda aparece cuando el páncreas se inflama repentinamente, pero recuperándose entonces de nuevo. Algunos pacientes padecen repetidas veces una pancreatitis aguda, pero cada vez pueden recuperarse completamente. Una pancreatitis aguda aparece repentinamente y puede ser una enfermedad grave, potencialmente mortal, que provoca numerosas complicaciones, pero normalmente los pacientes se recuperan de una pancreatitis aguda. La incidencia asciende aproximadamente de cinco a diez nuevos casos por 100.000 de habitantes por año.

Existen en dos formas de evolución:

1. *Pancreatitis edematosa*: evolución suave con hinchazón del órgano y necrosis reducida en el tejido graso del entorno
2. *Pancreatitis hemorrágica – necrosante*: necrosis extensa y hemorragias en el páncreas y en el entorno; por su cuadro clínico fulminante denominada con frecuencia también como apoplejía pancreática.

La valoración morfológica del páncreas, especialmente la diferenciación entre pancreatitis edematosa y necrosante se logra del mejor modo con la tomografía computarizada reforzada con medio de contraste. Para la clasificación del grado de gravedad ha dado buen resultado la puntuación de Balthazar (de 0 a 10 puntos).

La pancreatitis aguda puede tener varias causas. Con la mayor frecuencia son cálculos biliares que se bloquean de manera transitoria o durante más tiempo en la boca del conducto biliar en el duodeno, que al mismo tiempo es la boca del conducto pancreático. (Aproximadamente el 45 % de las pancreatitis agudas). Asimismo, una causa muy habitual es el abuso crónico del alcohol (aproximadamente el 35 %). En aproximadamente el 15 % de los afectados

no puede determinarse ningún agente desencadenante concreto, en estos casos se habla de génesis idiopática. Además existen también causas más raras tales como:

- Como efecto secundario de medicamentos (por ejemplo asparaginasa, azatioprina, furosemida, glucocorticoides, antibióticos (tetraciclinas, sulfametoxazol, trimetoprim), anticonvulsivos (valproato, carbamazepina), propofol y otros
- Infecciones por ejemplo paperas, por virus coxsackie, hepatitis, VIH, virus citomegálico
- Valor elevado del calcio en la sangre, por ejemplo en el caso de hiperparatiroidismo
- Grasas sanguíneas (triglicéridos) altamente elevadas
- iatrogénica por ERCP
- genética: fibrosis quística

Una pancreatitis aguda se hace notar al principio por dolores en la parte superior del vientre (desde el lado izquierdo hasta todo el vientre) (epigastrio), que irradian en el tórax, y desaparecen tras algunos días. Los dolores son con frecuencia muy fuertes y en parte también constantes. Los dolores pueden ser repentinos e intensos, o comenzar como dolores leves y tras la ingesta de alimentos (por la estimulación del páncreas durante la formación de enzimas pancreáticas con el fin de digerir la comida) volverse peores. El vientre puede estar hinchado y muy sensible. En el examen corporal son característicos un abdomen sensible a la presión y la denominada distensión abdominal, que se debe al meteorismo y defensa muscular (moderada). Asimismo pueden producirse dolores en la región inferior de la columna torácica. Al principio, este dolor es similar a un ligero lumbago, pero en lo sucesivo se desarrolla más hacia "punzada", desde la espalda hasta la región de la cabeza del páncreas en el lado del vientre.

Habitualmente los pacientes con una pancreatitis aguda parecen muy enfermos y también se sienten así. Otros síntomas son por ejemplo malestar, vómitos, estreñimiento, fiebre, pulso elevado. En casos graves se producen ictericia (en caso de obstrucción de los conductos biliares), hidropesía (ascitis) (en caso de obstrucción del sistema de la vena porta), efusión pleural así como signos de choque y de septicemia.

Desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio puede detectarse un recuento leucocitario elevado (leucocitosis) así como un aumento de la concentración de enzimas pancreáticas (por ejemplo tripsina, amilasas, lipasa). También pueden ser elevados los valores en sangre de calcio, magnesio, sodio, potasio, bicarbonato, azúcar, o grasa.

Alrededor del 20 % de los casos de pancreatitis aguda son graves. El paciente puede deshidratarse y desarrollar una baja presión arterial. A veces se produce insuficiencia cardiaca, pulmonar o renal. En el peor de los casos, una pancreatitis aguda conduce a hemorragias, shock y a veces a la muerte.

Según la actual clasificación de Atlanta la pancreatitis aguda leve se diferencia de la grave.

Una antigua clasificación subdividía una forma edematosa (fase temprana), una forma hemorrágica con hemorragias locales o generalizadas y una forma necrosante aguda.

Una pancreatitis crónica tiene muchas causas, pero del 70 al 80 % se deben al abuso crónico del alcohol. Aparece con mayor frecuencia en hombres que en mujeres y se desarrolla con frecuencia entre los 30 y los 40 años de edad. Una pancreatitis crónica puede desarrollarse también a partir de una inflamación aguda, cuando la causa no se elimina o el conducto excretor está dañado.

Algunas pancreatitis crónicas son hereditarias. Éstas se basan en una anomalía de las enzimas formadas por el páncreas que dañan el tejido. Otras formas de la enfermedad tienen su causa en factores externos tales como por ejemplo el consumo de tabaco.

En las fases tempranas de una pancreatitis, con frecuencia el médico no puede decidir si se trata de una forma aguda o una forma crónica. Los síntomas pueden ser los mismos.

Una pancreatitis crónica origina con frecuencia dolores crónicos. En algunos casos de pancreatitis crónica el dolor se calma cuando la enfermedad avanza. Conduce también a una hipofunción de la actividad pancreática, lo que conduce a pérdida de peso y alteraciones en la digestión. La digestión y reabsorción insuficientes conducen a la eliminación de grasa y proteína a través de las heces. Cuando las células endocrinas (islotos de Langerhans) en el páncreas están dañadas, puede desarrollarse una diabetes.

Un diagnóstico de la pancreatitis crónica es difícil, pero se encuentran disponibles algunas técnicas médicas avanzadas. Las pruebas sanguíneas de la función del páncreas pueden ayudar a decidir si el páncreas puede aún producir suficientes enzimas digestivas. No obstante, apenas se han realizado en la práctica.

Las anomalías del páncreas pueden reconocerse también mediante monografía, ERCP y tomografía computarizada.

En fases avanzadas de una pancreatitis crónica, cuando aparecen diabetes y reabsorción defectuosa, el médico puede realizar también pruebas de sangre, orina y de heces, para establecer un diagnóstico.

Una pancreatitis crónica se trata con la prescripción de analgésicos y un cambio en la alimentación. Los pacientes

pueden reducir la pérdida de grasa y proteína tomando medicamentos que contienen enzimas pancreáticas. Esto tendrá como consecuencia una mejor alimentación y un aumento de peso. A veces se prescriben insulina u otros medicamentos para controlar la glucemia.

5 En algunos casos de pancreatitis crónica se efectúa una intervención quirúrgica para mitigar los dolores, descargándose un conducto pancreático agrandado y atascado.

10 En una forma de realización preferida adicional de la invención, la secuencia de aminoácidos del péptido GP2 es homóloga al menos al 80 %, preferentemente al 90 % con la secuencia según la SEQ ID NO. 1. Es decir, la invención se refiere a todos los péptidos, que presentan una homología del 80 %, preferentemente del 90 % con la secuencia según la SEQ ID NO. 1. Naturalmente estos homólogos pueden estar modificados mediante delección, adición, sustitución, translocación, inversión y/o inserción de la secuencia según la SEQ ID NO.1. Esta modificación se refiere a péptidos homólogos que tienen funciones análogas. Los péptidos en el sentido de la invención tienen funciones análogas cuando interaccionan específicamente con autoanticuerpos que está asociados con las enfermedades mencionadas anteriormente.

15 Por consiguiente son objeto de la invención el péptido dado a conocer así como los homólogos que pueden usarse con función análoga. En lo que se refiere a la homología / análogos funcionales, el experto conoce que puede efectuar modificaciones mediante adiciones, delecciones o sustituciones, sin que se modifique esencialmente el polipéptido. La secuencia de aminoácidos modificada no está esencialmente cambiada, cuando cumple la misma función que la secuencia según la SEQ ID NO. 1 y en concreto esencialmente de esta manera, condictiendo a este respecto al mismo resultado.

20 Péptidos, análogos funcionales pueden ser por ejemplo la SEQ ID NO. 2

**MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYGNPIEASSYGLDLDCGAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGEVGGVVMSETCVQVHRCQTDAP
MWLNGTHPALGDGITNHTACAHWSGNCCFWKTEVLVKACPGGYHVYRLEGTPWCNLRYS
TVPRDPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVK**

**VDKCLLGGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKN
TSLVNDFIIRDITILNINFQCAYPDMKVSLSQAALQPIVSSLNVSVDGNGEFIVRMALFQDQNY
TNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQQGDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQ
RDSTIHVEENGQSSESRSFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCSRSQVRSE
VPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVAWPMVLLTVLLAWLF^**

o la SEQ ID NO. 3

**MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYGNPIEASSYGLDLDCGAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGEVGGVVMSETCVQVHRCQTDAP
MWLNGTHPALGDGITNHTACAHWSGNCCFWKTEVLVKACPGGYHVYRLEGTPWCNLRYS
TDPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKVVK
CLLGGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSL
VNDFIIRDITILNINFQCAYPDMKVSLSQAALQPIVSSLNVSVDGNGEFIVRMALFQDQNYTNP
YEGDAVELSVESVLYVGAILEQQGDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQ
RDSTIHVEENGQSSESRSFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCSRSQVRSE
VPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVAWPMVLLTVLLAWLF**

o la SEQ ID NO. 4

**MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRVPRDPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTW
GCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKVVKDKCLLGGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEE
RNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITILNINFQCAYPDMKVSLSQA
ALQPIVSSLNVSVDGNGEFIVRMALFQDQNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQQGDTSRF
NLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSESRSFSVQMFMFAGHYD
LVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCSRSQVRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPS
TAGFLVAWPMVLLTVLLAWLF**

25

o también la SEQ ID NO. 5

MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRDPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTWGC
 CRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKVDKCLLGLGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEERN
 WVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITLNINFQCAYP LDMKVSLQAALQ
 PIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQDQNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLV
 LRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSSRFSVQMFMFAGHYDLVFL
 HCEIHLCDSLNEQCQPSCSRSQVRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGF
 LVAWPMVLLTVLLAWLF

Los péptidos mencionados se reivindican especialmente para diagnóstico para las enfermedades inflamatorias del intestino expuestas anteriormente. Las secuencias mencionadas cumplen esencialmente la misma función esencialmente por la misma ruta y producen esencialmente el mismo resultado que la secuencia SEQ ID NO. 1. Se abarcan por tanto por la enseñanza según la invención, el uso de la molécula GP2 para el uso como fármaco para el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino.

Las secuencias de aminoácidos, es decir los péptidos en el sentido de la invención, pueden comprender por tanto tantos aminoácidos, espaciadores u otras estructuras como para ser adecuados para interaccionar con autoanticuerpos, preferiblemente de modo que representan un epítipo para los mismos. Por consiguiente la secuencia según la invención no está limitada a los péptidos, que se refieren a epítipos de anticuerpos, sino que se refieren a la molécula y todos los fragmentos de la misma que interaccionan de manera específica con los autoanticuerpos de manera que es posible un diagnóstico de las enfermedades inflamatorias del intestino. Los términos epítipo y péptido así como secuencia de aminoácidos pueden usarse por tanto como sinónimos en las formas de realización preferidas en el sentido de la invención.

En el estado de la técnica se dan a conocer distintas posibilidades para la producción de péptidos con función análoga. Los péptidos que se diseñan con tales procedimientos partiendo de los péptidos según la invención, se abarcan por la enseñanza de la presente invención. Una posibilidad de generación de péptidos con función análoga se describe por ejemplo en PNAS EE.UU. 13 de octubre de 1998; 9521:12179-84, documento WO 99/6293 y/o documento WO 02/38592; estas enseñanzas están recogidas en el contenido de la divulgación de la invención. Es decir, todos los péptidos, fragmentos de péptidos o estructuras que comprenden péptidos, que se generaron con el procedimiento mencionado (partiendo de los péptidos según la invención), son péptidos en el sentido de la invención, siempre que resuelvan el objetivo según la invención, especialmente interaccionan con los autoanticuerpos que provocan enfermedades. En el caso de estos autoanticuerpos puede tratarse por ejemplo de autoanticuerpos agonistas que activan receptores. En una forma de realización preferida adicional de la invención tiene lugar el uso de la molécula GP2 como autoantígenos soluble o unido a la fase sólida para la detección de autoanticuerpos directa o indirecta en heces y/o fluidos corporales especialmente sangre y/o suero, habiendo resultado ser especialmente ventajoso en este sentido el uso de la molécula GP2 según la SEQ ID NO. 1.

En una forma de realización preferida adicional de la invención especialmente las secuencias o péptidos según la solicitud, que se generan a partir de las mismas, están inmovilizados. Especialmente la molécula GP2 unida a la fase sólida según la SEQ ID NO. 1 está unida a polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos y/o mixtos, preferiblemente agarosa, celulosa, gel de sílice, poliamidas y/o poli(alcoholes vinílicos). En el sentido de la invención, por inmovilización se entienden también distintos procedimientos y técnicas para fijar los péptidos en determinados soportes por ejemplo según el documento WO 99/56126 o el documento WO 02/26292. La inmovilización puede servir por ejemplo para la estabilización de los péptidos, mediante lo cual éstos, especialmente durante el almacenamiento o en un planteamiento de un solo lote, no ven reducida ni modificada de manera desventajosa su actividad por efectos biológicos, químicos o físicos. Mediante la inmovilización de los péptidos es posible un uso repetido en condiciones de rutina técnica o clínica; además una muestra, preferentemente de componentes de la sangre, puede hacerse reaccionar con al menos uno de los péptidos según la invención. Esto puede conseguirse especialmente mediante distintas técnicas de inmovilización, teniendo lugar la unión de los péptidos a otros péptidos o moléculas o a un soporte, de modo que no se modifica la estructura tridimensional, especialmente en el centro, que facilita la interacción con los autoanticuerpos, de las moléculas correspondientes, especialmente de los péptidos. De manera ventajosa no se pierde la especificidad hacia los autoanticuerpos de los pacientes mediante la inmovilización. En el sentido de la invención pueden usarse tres métodos fundamentales para la inmovilización:

(i) Entrecruzamiento: en el entrecruzamiento los péptidos se fijan entre sí sin que su actividad se vea afectada de manera desventajosa. Por el entrecruzamiento, de manera ventajosa, ya no son solubles.

(ii) Unión a un soporte: la unión a un soporte tiene lugar por ejemplo mediante adsorción, unión iónica o unión covalente. Esto puede tener lugar también dentro de células microbianas o liposomas u otras estructuras abiertas o que contienen membrana. De manera ventajosa, la actividad de los péptidos no se ve afectada por la fijación. Los péptidos pueden ventajosamente por ejemplo usarse en la práctica clínica en el diagnóstico o la terapia de manera continua o varias veces unidos a soporte.

(iii) Inclusión: la inclusión tiene lugar en el sentido de la invención especialmente en una membrana semipermeable en forma de geles, fibrillas o fibras. Los péptidos encapsulados están separados por una solución de muestra rodeada por una membrana semipermeable de modo que de manera ventajosa pueden aún interactuar con los autoanticuerpos o con fragmentos de los mismos. Para la inmovilización se encuentran disponibles distintos procedimientos, tales como por ejemplo la adsorción a un soporte orgánico o inorgánico eléctricamente cargado o inerte. Tales soportes pueden ser por ejemplo geles porosos, óxido de aluminio, bentonita, agarosa, almidón, nailon o poliacrilamida. La inmovilización tiene lugar a este respecto mediante fuerzas de unión físicas, con frecuencia con la participación de interacciones hidrófobas y uniones iónicas. Los métodos de este tipo son de manera ventajosa fáciles de aplicar e influyen sólo en escasa medida en la conformación de los péptidos. Mediante las fuerzas de unión electrostáticas entre los grupos cargados de los péptidos y del soporte puede mejorarse de manera ventajosa la unión, por ejemplo mediante el uso de intercambiadores iónicos, especialmente Sephadex.

Un procedimiento adicional es la unión covalente a materiales de soporte. Los soportes pueden presentar para ello grupos reactivos que con cadenas laterales de aminoácido aceptan uniones homopolares. Grupos adecuados en los péptidos son grupos carboxilo, hidroxilo y sulfuro y especialmente los grupos amino terminal de lisinas. Los grupos aromáticos ofrecen la posibilidad de acoplamientos diazo. La superficie de partículas microscópicas de vidrio poroso puede activarse mediante tratamiento con silanos y a continuación hacerse reaccionar con péptidos. Los grupos hidroxilo de polímeros naturales pueden activarse por ejemplo con bromuro de cianógeno y a continuación se acoplan con péptidos. Con resinas de poliacrilamida, numerosos péptidos pueden aceptar de manera ventajosa uniones covalentes. En el caso de la inclusión en redes tridimensionales, los péptidos se incluyen en geles ionotrópicos u otras estructuras conocidas por el experto. Los poros de la matriz están hechos especialmente de manera que se retienen los péptidos y es posible una interacción con la molécula objetivo. En el caso del entrecruzamiento se transforman los péptidos mediante reticulación con agentes bifuncionales en agregados poliméricos. Las estructuras de este tipo son gelatinosas y fácilmente deformables y especialmente adecuadas para el uso en distintos reactores. Mediante la adición de otros componentes inactivos, tales como por ejemplo gelatinas, en el caso de la reticulación, pueden mejorarse las propiedades de unión y mecánicas de manera ventajosa. En el caso de la microencapsulación el espacio de reacción de los péptidos se delimita con ayuda de membranas. La microencapsulación puede realizarse por ejemplo como polimerización por interfase. Mediante la inmovilización en el caso de la microencapsulación los péptidos se vuelven insolubles y de este modo pueden usarse de nuevo. En el sentido de la invención son péptidos inmovilizados todos los péptidos que se encuentran en un estado que permite usarlos de nuevo. La limitación de la movilidad y de la solubilidad de los péptidos en rutas químicas, biológicas o físicas conducen de manera ventajosa a bajos costes de procedimiento, especialmente en el caso de la eliminación de autoanticuerpos de componentes de la sangre.

En una forma de realización preferida adicional de la invención se usan además de la molécula GP2 según la SEQ ID NO. , soluble o unida a la fase sólida, moléculas de adsorbedor no específicas, seleccionadas del grupo que comprende proteína A, proteína G, inmunoglobulina anti-ser humano o L-triptófano.

En una forma de realización preferida adicional de la invención, la molécula GP2 según la SEQ ID NO. 1 se encuentra de forma lineal o en forma cilíndrica, teniendo lugar la ciclación de péptido en el caso de la existencia de dos cisteínas mediante enlace puente disulfuro o mediante ciclación de amida, que tiene lugar de manera opcional a través de las cadenas laterales, a través de los extremos C y N terminales o mediante una combinación de estas posibilidades. Esta variante de la molécula GP2, en el caso del procedimiento mencionado, pueden conducir a una mayor estabilidad de la molécula GP2 en presencia de distintos tampones desnaturizantes.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un agente inmunogénico con el uso de GP2 según la SEQ ID NO.1 para la producción de un medicamento para su aplicación en el diagnóstico o el control terapéutico de las enfermedades inflamatorias del intestino mencionadas anteriormente, que van acompañadas de una reacción inmunitaria contra estas sustancias. Sorprendentemente, con las secuencias descritas de GP2 pueden producirse también medicamentos fáciles de aplicar, que el paciente puede usar o tomar por sí solo siguiendo las instrucciones del médico. De esta manera no es necesario ningún tratamiento estacionario. La descripción se refiere también a un instrumental para pruebas de diagnóstico (kit) para la determinación de enfermedades autoinmunitarias, que comprende una molécula GP2 según la SEQ NO. 1. Opcionalmente el instrumental para prueba de diagnóstico o el kit comprende instrucciones para combinar el contenido del instrumental de prueba y/o para proporcionar una formulación para la detección de enfermedades inflamatorias del intestino, que comprenden la enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa. Estas instrucciones pueden ser por ejemplo un prospecto u otro medio, lo que proporciona información al usuario sobre en qué procedimiento han de usarse las sustancias mencionadas. Naturalmente, no es forzosamente necesario que la información sea un prospecto, es posible que esta información se comunique por ejemplo a través de internet. Este kit tiene para los pacientes por ejemplo el efecto ventajoso de que sin recurrir directamente a un médico, también durante viajes puede conocer el grado actual de su enfermedad y opcionalmente puede adaptar su dieta y sus actividades de manera correspondiente.

La enseñanza según la solicitud se caracteriza por las siguientes características:

- el abandono de la técnica habitual

- una nueva formulación de tareas
- la existencia de una urgente necesidad sin resolver desde hace tiempo de la solución del problema resuelto con la invención
- los esfuerzos hasta ahora en vano de los expertos
- 5 - la sencillez de la solución es una prueba de la actividad inventiva, especialmente dado que ésta sustituye a enseñanzas complicadas
- el desarrollo de la técnica científica iba en otra dirección
- ejecución que simplifica el desarrollo
- conceptos erróneos de los expertos sobre la solución del problema correspondiente (prejuicio)
- 10 - progreso técnico, tal como por ejemplo: mejora, aumento del rendimiento, abaratamiento, ahorro de tiempo, material, etapas de trabajo, costes o materias primas difícilmente conseguibles, elevada fiabilidad, eliminación de errores, aumento de la calidad, ausencia de mantenimiento, mayor eficacia, mayor rendimiento, incremento de las posibilidades técnicas, provisión de un medio adicional, apertura de una segunda ruta, apertura de un nuevo campo, primera solución de un objetivo, medio de reserva, alternativas, posibilidad de racionalización, automatización o miniaturización o enriquecimiento del arsenal de fármacos
- 15 - un golpe de suerte, dado que a partir de una pluralidad de posibilidades se seleccionó una determinada, cuyo resultado no podía predecirse, por tanto se trata de un golpe de suerte patentable)
- error en expectativas
- campo reciente de la técnica
- 20 - invención de combinación, es decir se reúnen varios elementos conocidos dando una combinación que presenta un efecto sorprendente
- concesión de licencias
- elogio de los expertos y
- éxito económico.

25 Estas propiedades se refieren especialmente a las formas de realización preferidas de la invención.

A continuación se explicará en detalle la invención con ayuda de un ejemplo, sin limitarse a este ejemplo.

Métodos

Purificación de GP2 a partir de páncreas de rata

Obtención de gránulos de zimógeno (GZ) y purificación de las membranas de GZ

- 30 Todas las etapas de trabajo siguientes se han realizado en el baño de hielo o con enfriamiento hasta 4 °C Celsius. Se trituró mecánicamente el páncreas de cuatro ratas Wistar adultas (aproximadamente 2,4 g de tejido) y se digirió en un volumen de diez veces más de solución de sacarosa 0,3 M helada en un homogeneizador POTTER (2 carreras a 1000 rpm y 2 carreras a 1300 rpm). A continuación se separó la digestión filtrando a través de una gasa. Mediante centrifugación a 500 g durante 10 min se separaron los residuos celulares y el núcleo. A partir del
- 35 sobrenadante se depositaron mediante centrifugación a 3000 g durante 10 min los gránulos de zimógeno (sedimento sólido blanco, inferior) y las mitocondrias (sedimento pardo suelto, encima). Las mitocondrias se arrastran con cuidado por medio de tampón A (ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 10 mM, pH 6,8) y los gránulos de zimógeno se resuspenden en 2 ml de solución de carbonato de sodio 0,1 M, diisopropilfluorofosfato (DFP) 1 mM, por medio de agitador vortex. La lisis de los gránulos tuvo lugar durante 1 h en el baño de hielo. La mezcla madre de
- 40 lisis se estratificó sobre un gradiente de sacarosa discontinuo (0,3 M / 1 M) y se centrifugó a 200.000 g durante 90 min. Se reunió la fracción de membrana como banda en la capa límite de densidad. La banda se aspiró y la solución obtenida se ajustó a 0,3 M con bromuro de sodio. Mediante centrifugación a 200.000 g durante 60 min se sedimentaron las membranas.

Solubilización de la GP-2

- 45 El sedimento de membrana obtenido se resuspendió en 0,5 ml de tampón B (ácido morfolinoetanosulfónico (MES) 20 mM, pH 7,0; KCl 80 mM; saponina 45 µg/ml) por medio de ultrasonidos y tras la adición de fosfolipasa C específica de fosfatidilinosol (*B. cereus*) mediante incubación a lo largo de 1 h a 37 °C se separó GP2 de la membrana. Las membranas se sedimentaron mediante centrifugación (200.000 g, 60 min) y el sobrenadante se concentró con la GP-2 soluble mediante ultrafiltración de aproximadamente 1 a 5.
- 50 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente a GP2

- Se recubrieron placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc, Roskilde) con 50 µl/cavidad de una solución de GP2 de rata 10 µg/ml en tampón de recubrimiento (carbonato de Na 100 mM, pH 9,6), durante la noche a 4 °C. Tras un lavado de la placa de microtitulación con un tampón de lavado (fosfato de Na 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,4) se incubaron las cavidades con 300 µl de la solución de bloqueo (tampón de lavado, albúmina de suero
- 55 bovino (RSA) al 1 %, pH 7,4) durante 30 min a temperatura ambiente (TA). A continuación se lavaron las cavidades tres veces con tampón de lavado y 50 µl 1/100 en tampón de dilución (fosfato de Na 10 mM, NaCl 150 mM, RSA 1 %) de muestras de suero humano diluidas durante 60 min a TA por cavidad. Tras lavar tres veces con tampón de

5 dilución se llenaron las cavidades con 50 µl de solución de conjugado (IgG anti-ser humano IgG-peroxidasa, oveja, 1 µg/ml, tampón de dilución) y se incubaron durante 30 min a TA. A continuación se lavaron las cavidades de nuevo tres veces y se dispensaron 50 µl de la solución de sustrato (tetrametilbencidina) por cavidad. Tras 10 min de incubación a TA tuvo lugar la detención de la reacción del sustrato mediante la adición de 50 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,3 M). La densidad óptica de la solución en las cavidades individuales se midió por medio de un fotómetro de placas de microtitulación de manera dicromática a 450 nm y 620 nm y se evaluó con asistencia por ordenador con el programa informático EIAstar.

Inmunofluorescencia indirecta (IIF) para la determinación de anticuerpos frente a antígenos pancreáticos

10 Para la determinación de anticuerpos frente a antígenos pancreáticos por medio de IIF se usaron secciones de páncreas de mono comerciales (Euroimmun, Lübeck). Se diluyeron las muestras de suero con tampón de dilución 1/40, 1/80 y 1/160. Por campo de reacción del soporte de reactivo se pipetearon 25 µl de suero diluido y se incubaron los portaobjetos con las secciones de tejido 30 min a TA. A continuación se lavaron los portaobjetos con un tampón fosfato durante 1 min. Por campo del soporte de reactivo purificado se pipetea entonces 20 µl de antisuero marcado (IgG-anti-ser humano-FITC) y se incubaron con las secciones de tejido sobre los portaobjetos durante 30 min a TA. Tras lavar de nuevo con tampón fosfato durante 1 min, con ayuda de un medio de montaje se dotó al portaobjetos de un cubreobjetos. La valoración de la fluorescencia tuvo lugar con ayuda de un microscopio de fluorescencia.

Bibliografía

- Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006, 52 (2): 171-181.
- 20 Fukuoka S-I. Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding α (large) and β (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *BBA* 2000, 1491, 376-380
- Fricke H, Birkhofer A, Folwaczny C, Meister W, Scriba PC. Characterization of antigens from the human exocrine pancreatic tissue (Pag) relevant as target antigens for autoantibodies in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29:41-45.
- 25 Documento WO 01/94409 (CORIXA CORP [US]; Hirst Shannon K [US]; Harlocker Susan L [US]; Dillon) 13. Dezember 2001 (2001-12-13) Compositions and methods for the therapy and diagnosis of pancreatic cancer.
- Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, Parratt D. Antibody to *saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ*, 297: 1105-1106.
- 30 Mayet WJ, Press AG, Hermann E, Moll R, Manns M, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Antibodies to cytoskeletal proteins in patients with Crohn's disease. *Eur J Clin Invest*, 1990, 20: 516-524.
- Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann K H. Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease. *Gut* 1991, 32: 1192-1197.
- Documento WO 96/17873 A (Alphagene INC [US]) 13 de junio de 1996 (1996-06-13) Diagnosis of pancreatitis.
- 35 Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 1987, 22 (supl 139), 41-52.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la detección de anticuerpos en heces y/o fluidos corporales especialmente sangre y/o suero para el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino, seleccionadas del grupo que comprende enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa, mediante una reacción inmunitaria con GP2 según la SEQ ID NO. 1, o una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos, que presenta una homología con la SEQ ID NO. 1, ascendiendo la homología al menos al 80 %, preferiblemente al 90 %, comprendiendo la reacción inmunitaria una unión de un anticuerpo a un antígeno y siendo GP2 según la SEQ ID NO. 1 el antígeno.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la detección se realiza en un inmunoensayo, preferiblemente con acoplamiento directo o indirecto de un componente de reacción con una sustancia de marcado excluyendo pruebas de inmunofluorescencia a base de secciones de tejido.
- 15 3. Uso de la molécula GP2 según la SEQ ID NO. 1 como antígeno para el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino (EII), teniendo lugar el diagnóstico y/o el control terapéutico *ex vivo*.
- 15 4. Uso de la molécula GP2 según la reivindicación 3, caracterizado porque la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa.
- 20 5. Uso de la molécula GP2 según una de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado porque la molécula GP2 está presente de forma lineal o en forma cilíndrica, teniendo lugar la ciclación de péptido en el caso de la existencia de dos cisteínas mediante enlace puente disulfuro o mediante ciclación de amida, que tienen lugar de manera opcional a través de las cadenas laterales, a través de los extremos C y N terminales o mediante una combinación de estas posibilidades.
- 25 6. Uso de GP2 según la SEQ ID NO. 1 según una o varias de las reivindicaciones anteriores, para el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino, usándose GP2 según la SEQ ID NO. 1 de forma soluble o unida a la fase sólida para la detección directa o indirecta de autoanticuerpos en fluidos corporales, especialmente sangre, suero y/o heces.
- 25 7. Uso de GP2 según la SEQ ID NO. 1 según una o varias de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula GP2 unida a la fase sólida según la SEQ ID NO. 1 está unida a polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos y/o mixtos, preferiblemente agarosa, celulosa, gel de sílice, poliamidas y/o poli(alcoholes vinílicos).
- 30 8. Uso de GP2 según la SEQ ID NO. 1 o una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos, que presenta una homología con la SEQ ID NO. 1, ascendiendo la homología al menos al 80 %, preferiblemente al 90 %, para la producción de un medicamento para su aplicación en el diagnóstico y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino, seleccionadas del grupo que comprende enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa, que van acompañadas de una reacción inmunitaria contra estas sustancias, usándose GP2 según la SEQ ID NO. 1 como antígeno y uniéndose a autoanticuerpos.
- 35 9. Uso de GP2 preferentemente según la SEQ ID NO. 1 o una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos, que presenta una homología con la SEQ ID NO. 1, ascendiendo la homología al menos al 80 %, preferiblemente al 90 %, para la producción de un medicamento para su aplicación en el diagnóstico oral y/o el control terapéutico de enfermedades inflamatorias del intestino, seleccionadas del grupo que comprende enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica y/o colitis ulcerosa, que van acompañadas de una reacción inmunitaria contra estas sustancias, usándose GP2 según la SEQ ID NO. 1 como antígeno y uniéndose a autoanticuerpos.