

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 583**

21 Número de solicitud: 201032013

51 Int. Cl.:

C12N 9/38 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **30.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.07.2012

71 Solicitante/s:
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
Avda. de la Constitución 18
41071 Sevilla, ES

72 Inventor/es:
GÓMEZ-CHAPARRO MORENO, José Luis

74 Agente/Representante:
Illescas Taboada, Manuel

54 Título: **Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y para evaluar la respuesta al tratamiento**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y para evaluar la respuesta al tratamiento.

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico en un estadio temprano de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, y en particular de la enterocolitis necrotizante, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dichas enfermedades, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz. Kit que comprende los medios necesarios para llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 385 583 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y para evaluar la respuesta al tratamiento.

5 La presente invención se encuentra dentro de la medicina, la enzimología y la biología molecular, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, y en particular de la enterocolitis necrotizante en un estadio temprano, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dichas enfermedades, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 La necrosis isquémica intestinal, aparece cuando el flujo sanguíneo del territorio mesentérico resulta insuficiente para satisfacer las necesidades requeridas por el intestino. A diferencia de las formas crónicas, en las que el desarrollo progresivo de colaterales impide la necrosis intestinal, en las formas de instauración aguda, la viabilidad del intestino puede quedar comprometida, abocando a una situación de riesgo vital. El suministro de oxígeno a las células depende de una compleja interacción de factores: flujo de sangre que circula por los vasos principales, concentración de hemoglobina y su saturación de oxígeno, distribución de sangre en la pared intestinal, intercambio de oxígeno entre la capa más basal de la mucosa y la porción más distal, balance entre las demandas metabólicas y el aporte real de oxígeno y nutrientes en la mucosa, capacidad de las propias células para utilizar el oxígeno...etc, pero independientemente del mecanismo que desencadene la isquemia, la secuencia de hechos posterior es muy parecida.

20 El infarto intestinal en la anatomía patológica microscópica conlleva: edema, congestión, hemorragia y necrosis con desprendimiento de la mucosa. Se puede presentar como infarto hemorrágico, úlceras aisladas o serpiginosas, placas mucosas con pseudomembranas...etc. Puede afectarse cualquier segmento intestinal. Los cambios isquémicos pueden ser parcheados o difusos, y consisten en hemorragia de la lámina propia asociada a necrosis de la mucosa. Dependiendo de la duración de la hipoxia, los cambios pueden ser reversibles o llegar a infarto de todo el grosor de la pared. En las piezas de resección se pueden encontrar lesiones vasculares como trombosis o inflamación.

25 Atendiendo a su origen, las enfermedades que pueden cursar con isquemia intestinal principalmente se pueden clasificar en:

30 A).- de origen vascular

- Colitis isquémica (70-75%): Arterioesclerosis, Oclusión vascular (Embolia o trombosis mesentérica arterial, trombosis venosa, traumatismos), obstrucción del colon (impactación fecal, neoplasias), shock o estados de bajo gasto asociados a hipotensión (arritmias, insuficiencia cardíaca, diálisis, sepsis, deshidratación), tratamiento con medicamentos (digital, calcioantagonistas, sumatriptán, metisergida, vasopresina, agonistas alfa-adrenérgicos, antagonistas β -adrenérgicos, diuréticos, triptanes, AINE, ergotamina, danazol, sales de oro, neurolépticos, Interferón, fármacos psicótopos), enfermedades hematológicas (déficit de proteína C, déficit de proteína S, déficit de antitrombina III, anemia de células falciformes), enfermedad de pequeños vasos (diabetes mellitus, vasculitis, amiloidosis, artritis reumatoide, lesiones por radiación), cirugía de aorta abdominal, abuso de cocaína, corredores de larga distancia, Síndrome del intestino irritable e Idiopática (siendo la enterocolitis necrotizante la primera causa en la infancia).

35 - Isquemia mesentérica aguda (25-30%): Embolia de la arteria mesentérica superior 50%, trombosis de la arteria mesentérica superior 10%, isquemia mesentérica no oclusiva 25%, trombosis venosa mesentérica 10%. Primaria (30%): deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, policitemia vera, trombocitosis, neoplasias, anticonceptivos orales, embarazo, esplenectomía, anemia de células falciformes, síndrome mieloproliferativo. Secundaria (60%): Procesos sépticos intraabdominales: apendicitis, diverticulitis, colangitis, perforación gastrointestinal, abscesos...etc, pancreatitis aguda y crónica, enfermedad inflamatoria intestinal, hipertensión portal, gastroenteritis aguda, neoplasia, traumatismo abdominal), Isquemia focal segmentaria 5% (por embolias de colesterol, vasculitis, traumatismos o lesiones por radiación)

40 - Isquemia mesentérica crónica 5%.

50 B).- Otras causas no propiamente vasculares, son secundarias a enfermedades obstructivos intestinales tipo mecánicos: vólvulo, intususcepción, hernias, bridas ...etc.

55 La enterocolitis necrotizante (ECN) es la enfermedad gastrointestinal aguda y urgente más frecuente en neonatos. Su incidencia se estima 2,5 de cada 1000 recién nacidos vivos y 1-5% de los ingresos en las unidades neonatales, alcanzando el 12% en los menores de 1500 g al nacimiento. Tiene alta tasa de morbimortalidad, con gran repercusión en los costes de las unidades neonatales. Su patogenia es multifactorial y su fisiopatología aún no está clara.

5 El diagnóstico del sufrimiento intestinal se basa en la combinación de hallazgos clínicos y radiológicos, a menudo ambiguos y tardíos frente a los cambios anatomopatológicos. Por ello, los esfuerzos actuales se dirigen a la prevención de los factores de riesgo, al reconocimiento temprano de los signos-síntomas y al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, para minimizar los riesgos de la enfermedad y sus complicaciones. La variabilidad en la forma de presentación del cuadro clínico y la patocronía de la enfermedad dificultan, en ocasiones, el diagnóstico diferencial. El tratamiento inicial suele ser esencialmente médico y, en ocasiones, incluye la colocación de un catéter de drenaje peritoneal para la descompresión y el lavado de los mediadores inflamatorios exudados al peritoneo. En un 40% de los casos es necesaria la intervención quirúrgica que conlleva secuelas importantes a medio y largo plazo, y un aumento de las estancias medias de las unidades neonatales.

10 En 1978, Bell y cols. (*Ann Surg* 187(1):1-7) elaboraron un sistema clínico de estadiaje útil para comparar casos, más que para orientar el tratamiento:

- **Etapa I:** sospecha.
- **Etapa II:** enfermedad definida (signos radiológicos positivos)
- **Etapa III:** enfermedad avanzada: *shock* séptico y neumoperitoneo.

15 Posteriormente, Walsh y Kliegman (1986. *Pediatr Clin North Am* 33: 179-20) modificaron estos criterios en un intento de realizar una clasificación que sirviera mejor de guía para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes: "Clasificación de Bell modificada":

20 **Estadio 1A:** Signos sistémicos, como temperatura inestable, apnea, bradicardia y letargia; signos intestinales, como aumento del residuo gástrico, distensión abdominal leve y presencia de sangre en heces. Signos radiológicos, como distensión o íleo leve, aunque la radiología puede ser normal.

Estadio 1B: además de lo anterior, aparición de deposiciones sanguinolentas por el recto.

Estadio 2A: similares a lo anterior y además ausencia de ruidos intestinales o distensión abdominal; en la radiografía se observa dilatación intestinal, íleo y neumatosis.

25 **Estadio 2B:** a los mismos signos ya descritos, se agrega acidosis y trombocitopenia leves; en los signos intestinales se agrega ausencia de ruidos, tensión abdominal franca, celulitis abdominal o masa en cuadrante inferior derecho; al estudio radiográfico se agrega gas en la vena porta, con o sin ascitis.

30 **Estadio 3A:** se pueden ver los mismos efectos sistémicos que en el IIB, pero se añade hipotensión arterial, bradicardia, apnea grave, acidosis mixta, coagulación intravascular diseminada y neutropenia; en los signos intestinales, se agrega peritonitis generalizada, tensión abdominal moderada y distensión del abdomen; en los signos radiológicos se observa ascitis franca.

Estadio 3B: los signos sistémicos y gastrointestinales son los mismos que en el estadio anterior, pero en la radiografía se aprecia neumoperitoneo.

35 Las pruebas complementarias específicas para el diagnóstico de la enterocolitis necrotizante son escasas, e incluso infructuosas en lesiones iniciales. Tonometría y angiografía son las más sensibles y específicas en la isquemia incipiente, pero tienen una iatrogenia, costes elevados y no están accesibles en la mayoría de los hospitales. La mayoría de los biomarcadores serológicos utilizados son reactantes de inflamación sistémica con escasa especificidad, por lo que se hace necesario el desarrollo de test diagnósticos de biomarcadores séricos sensibles y específicos en tiempo real para el diagnóstico precoz y el manejo clínico-terapéutico de la ECN en neonatos.

40 Es necesario, por tanto, encontrar un método de diagnóstico precoz que minimice la iatrogenia y que favorezca la intervención precoz sobre los pacientes afectados, disminuyendo las secuelas, las intervenciones innecesarias y los días de estancia hospitalaria.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y particularmente para el diagnóstico *in vitro* rápido, sencillo y precoz de la enterocolitis necrotizante, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes.

50 Los autores de la invención han encontrado una relación entre un biomarcador sérico, la enzima beta-glucosidasa citosólica humana (BGC) y las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y concretamente con la enterocolitis necrotizante. La caracterización de la actividad de dicha enzima permite obtener parámetros sensibles y específicos en tiempo real para el diagnóstico precoz y el manejo clínico-terapéutico de dichas enfermedades, cuando se comparan con los valores normales, determinados en neonatos y lactantes sanos por los autores de la invención.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante. En una realización particular de la invención, la enfermedad es enterocolitis necrotizante.

10 En esta memoria se entiende por "enterocolitis necrotizante" (ECN ó NEC - *necrotizing enterocolitis*-), un síndrome gastrointestinal y sistémico que comprende síntomas variados y variables, como distensión e hipersensibilidad abdominal, sangre en heces, intolerancia a la alimentación, apnea, letargia, y en casos avanzados acidosis, sepsis, CID y *shock*. Es una cascada inflamatoria que se desencadena en recién nacidos con determinados factores de riesgo y que lleva a una necrosis de la pared intestinal (desde el punto de vista anatomopatológico se define como necrosis por coagulación e inflamación del intestino del lactante).

15 La enzima beta-glucosidasa citosólica (BGC) se halla, sobre todo, en el intestino delgado, aunque también se ha detectado en hígado y páncreas, pero no en otros órganos. En mamíferos, se han caracterizado tres formas de beta-glucosidasa: glucocerebrosido lisosomal (beta-glucosidasa ácida), hidrolasa de lactosaflorizina (LPH), y beta-glucosidasa citosólica. Se conoce bien el papel de las formas específicas de glucocerebrosidos y lactosaflorizina, relacionadas respectivamente con la enfermedad de Gaucher e intolerancia a lactosa del adulto. En cambio, no se reconoce aún ninguna función específica de la BGC, especulándose su papel detoxificador en la ingestión de
20 glucósidos vegetales, como amigdalina y prunasina.

25 La BGC pertenece a la familia 1 de glicosidasas [EC 3.2.1.21] e hidroliza beta-D-glicósidos, incluidos beta-D-glicósidos, beta-D-galactósidos (mayor actividad) así como beta-D-fucósidos, beta-D-xilósidos y beta-D-arabinósidos. Actúa como un monómero de 52-53 kDa, con pH óptimo 5.0-7.0, dependiendo menos del pH su actividad glucosidasa que la galactosidasa. Sus cinéticas de Michaelis-Menten tienen valores de Km de 0.04 y 0.05 mM para glucósidos y galactósidos, respectivamente. Mientras el taurocolato sódico la inhibe, como a las formas lisosomales, el conduritol-B-epóxido no la afecta, a diferencia de ellas.

En modelo animal, la BGC ha demostrado ser un marcador muy sensible y específico de la falta de irrigación del enterocito, siendo un biomarcador muy útil para determinar la isquemia del intestino delgado.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y

b) determinar la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana, en la muestra biológica aislada de (a).

35 En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además:

c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Siendo las cantidades de referencia por ejemplo, pero sin limitarnos, las recogidas en otra parte de la presente invención.

40 En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante. En una realización particular de la invención, la enfermedad es enterocolitis necrotizante.

En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

45 En otra realización preferida, el valor de la actividad BGC h a partir del cual se considera que el individuo padece la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es de 14 miliunidades enzimáticas (definiéndose la unidad enzimática como 1 nmol de producto por hora), más preferiblemente de 15 miliunidades enzimáticas, y aún más preferiblemente de 16 miliunidades enzimáticas.

50 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y aún más preferiblemente es el suero. En otra realización preferida se obtiene el cordón umbilical, y en otra realización más preferida, se obtiene del talón del individuo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana se determina mediante análisis fluorométrico. En otra realización preferida la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana se determina mediante análisis espectrofotométrico.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo,

b) determinar la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana en la muestra biológica aislada de (a).

c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia,

10 donde la alteración de dicha actividad es indicativa de enterocolitis necrotizante.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante. En una realización particular de la invención, la enfermedad es enterocolitis necrotizante.

15 En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

En otra realización preferida, el valor de la actividad BGC h a partir del cual se considera que el individuo padece la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es de 14 miliunidades enzimáticas, más preferiblemente de 15 miliunidades enzimáticas, y aún más preferiblemente de 16 miliunidades enzimáticas.

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y aún más preferiblemente es el suero. En otra realización preferida se obtiene el cordón umbilical, y en otra realización más preferida, se obtiene del talón del individuo.

25 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana se determina mediante análisis fluorométrico. En otra realización preferida la actividad de la beta-glucosidasa citosólica se determina mediante análisis espectrofotométrico.

La concentración de enzimas en suero es muy baja, sin embargo, dada su elevada capacidad catalítica, es posible determinar su actividad y presuponer que ésta es proporcional a su concentración. Por tanto, el estudio de las enzimas en el laboratorio se basa en la demostración "in vitro" de la actividad catalítica. Se puede determinar la actividad enzimática analizando:

30 - La aparición de algún producto

- La desaparición del sustrato

- La variación de un cofactor o de algún componente de la reacción.

Se determina la cantidad de sustrato formado por unidad de tiempo, en condiciones exactamente definidas (pH, Tª...) y estrictamente controladas.

35 La actividad enzimática, en esta memoria, se expresa en unidades enzimáticas, siendo esta la cantidad de enzima que transforma un 1 nmol de sustrato por hora en condiciones estándar previamente establecidas.

40 Para que una determinación enzimática sea válida es necesario realizarla en la fase lineal donde el único factor limitante es la concentración de la propia enzima y las condiciones de reacción son las óptimas (exceso de sustrato y otros reactivos...). Para ello se suele trabajar con una concentración de sustrato superior a la Km. Así, en un ensayo enzimático, el límite de linealidad es la actividad enzimática más alta que se puede medir con exactitud. Por encima de ese valor habrá que diluir el suero con solución salina y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de actividad constitutiva de la enzima, en un grupo de individuos sanos, o antes de ser sometidos a una intervención clínico-terapéutica.

45 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta

discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada es el suero.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física. Preferiblemente, el individuo es un neonato o un lactante.

La detección de la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la actividad de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permite diferenciar entre los diferentes estadios de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y particularmente de la enterocolitis necrotizante. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial, que permite subclasificarlos.

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana que permite discriminar entre individuos sanos o enfermos (que padecen enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y particularmente enterocolitis necrotizante) y/o que permite discriminar entre un determinado estadio de dichas enfermedades de otros estadios, o de otras enfermedades. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y particularmente que no padecen enterocolitis necrotizante.

La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación entre los pacientes afectados por enterocolitis necrotizante de los individuos sanos, la actividad constitutiva de la enzima beta-glucosidasa citosólica en un grupo control de individuos sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por enterocolitis necrotizante en función de sus manifestaciones, el grupo control estará formado por un grupo de enfermos con enterocolitis necrotizante que no tuvieron esa manifestación clínica.

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir del suero de un paciente con una enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal, y preferentemente con enterocolitis necrotizante, en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de individuos con enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal y en particular enterocolitis necrotizante en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

La enzima beta-glucosidasa citosólica humana (BGC h), tiene una secuencia aminoacídica que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_066024.1; y/o en la SEQ ID NO: 1).

En el contexto de la presente invención, la enzima beta-glucosidasa citosólica se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 5 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 10 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la enzima beta-glucosidasa citosólica. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_020973..

15 Se conoce la secuencia aminoacídica, estructura primaria, de la BGC h en su isoforma 1 (SEQ ID NO: 1), y se establecen una cadena de 469 residuos aminoacídicos. En la actualidad se conoce la isoforma 2 (SEQ ID NO: 2) que tiene una cadena aminoacídica de 162 residuos. En esta memoria, el término enzima beta-glucosidasa citosólica humana hace referencia tanto a la isoforma 1 como a la isoforma 2, como a cualquiera de sus variantes.

20 En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a la proteína sustancialmente homóloga a la enzima beta-glucosidasa citosólica, tanto a la isoforma 1 como a la isoforma 2. En general, una variante incluye adiciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, glicosilación, fosforilación o metilación. Se han descrito en la literatura (Beutler *et al.*, 2004. *J. Lab. Clin. Med.* 144:65-68(2004) diversas variantes naturales de la estructura primaria, como por ejemplo, pero sin limitarnos, cambios aminoacídicos puntuales (SNPs):

- 1.- Residuo 106 (SNP DxN).
- 2.- Residuo 172(SNP MxI).
- 3.- Residuo 213(SNP db RxP).
- 4.-Residuo 354 (dsSNP CxR).

30 La estructura secundaria de la BCG h, está compuesta de 20 alfa hélices con un total de 193 residuos aminoacídicos (41%) y 17 beta hojas plegadas con 76 residuos (16%) del total. El resto son zonas de enlace (43%). La estructura terciaria también se ha descrito (Tribolo, *et al.*, 2007. *J. Mol. Biol.* 370, 964-975). En grupos taxonómicos inferiores, se conocen estructuras cuaternarias, no así en primates y humanos, donde el monómero es activo.

35 Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la enzima beta-glucosidasa citosólica, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2, respectivamente a como se ha descrito anteriormente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homólogas a la enzima beta-glucosidasa citosólica pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

45 A su vez, atendiendo a los métodos de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de

forma diferencial en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende:

- 5 a) tomar una muestra biológica aislada de un individuo,
- b) detectar la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana, en la muestra biológica aislada de (a).
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, y
- 10 d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante. En una realización particular de la invención, la enfermedad es enterocolitis necrotizante.

15 En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

En otra realización preferida, el individuo es un neonato. En otra realización preferida, el individuo es un lactante.

20 En otra realización preferida, el valor de la actividad BGC h a partir del cual se considera que el individuo padece la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es de 14 miliunidades de actividad enzimática, más preferiblemente de 15 miliunidades de actividad enzimática, y aún más preferiblemente de 16 miliunidades de actividad enzimática.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y aún más preferiblemente es el suero. En otra realización preferida se obtiene el cordón umbilical, y en otra realización más preferida, se obtiene del talón del individuo.

25 En otra realización preferida de este aspecto de la invención la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana se determina mediante análisis fluorométrico. En otra realización preferida la actividad de la beta-glucosidasa citosólica se determina mediante análisis espectrofotométrico.

30 El término “seguimiento de la evolución”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento de la enterocolitis necrotizante, o a una intervención quirúrgica. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-tratamiento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana.

Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

35 Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención.

Dicho kit puede comprender todos aquellos reactivos necesarios para analizar la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. Así, por ejemplo, puede comprender, pero sin limitarse,

- 40 - 17-beta-estradiol-17'-beta-D-glucosido,
- 17-beta-estradiol-3'-beta-D-glucosido,
- 2,4-dinitrofenil-beta-D-galactosido
- 2-nitrofenil-alpha-L-arabinosido
- 45 - 2-nitrofenil-beta-D-glucopyranosido
- estrona-3-beta-D-glucosido
- ácido lactobionico
- feniletíl-beta-D-galactosido
- 4-metilumbelliferil-beta-D-arabinopiranosido
- 4-metilumbelliferil-beta-D-xylopiranosido
- 50 - 4-nitrofenil-alpha-L-arabinopiranosido
- 4-nitrofenil-beta-D-fucopiranosido
- 4-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido
- 4-nitrofenil-beta-L-arabinopiranosido

- 4-O-beta-D-glucopiranosil-D-glucosa
- glucosil ceramide
- daidzeina-7-malonil-beta-D-glucopiranosido
- genisteina-7-beta-D-glucopiranosido
- 5 - p-nitrofenil-beta-D-xilopiranosido
- p-nitrofenil-beta-L-arabinopiranosido
- quercetina-3,4'-di-beta-D-glucopiranosido
- 4-metilumbelliferil-beta-D-glucopiranosido
- 10 - 4-nitrofenil-beta-D-galactosido
- 4-metilumbelliferil-beta-D-galactopiranosido
- 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido
- metil-beta-D-glucosido
- daidzeina-7-beta-D-glucopiranosido
- eriodictiol-7-beta-D-glucopiranosido
- 15 - luteolina-7-beta-D-glucopiranosido
- naringenina-7-beta-D-glucopiranosido
- p-nitrofenil-alpha-L-arabinopiranosido
- p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido
- luteolin-3',7'-dibeta-D-glucopiranosido
- 20 - quercetina-4'-beta-D-glucopiranosido
- quercetina-7-beta-D-glucopiranosido
- apigenina-7-beta-glucopiranosido
- 4-metilumbelliferil beta-D-glucosido

En una realización preferida, el kit comprende 4 metil-umbeliferil-beta-d-glucopiranosido.

- 25 El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

- 30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, y preferentemente de la enterocolitis necrotizante.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

- 35 Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 45 Fig. 1. Representación de la curva ROC de la actividad enzimática BGCh en enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal

Fig. 2. Estructura terciaria de la beta-glucosidasa citosólica humana.

EJEMPLOS

- 50 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de la invención para obtener datos útiles en el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y preferentemente de la enterocolitis necrotizante, y para el diagnóstico y el seguimiento de dicha enfermedad.

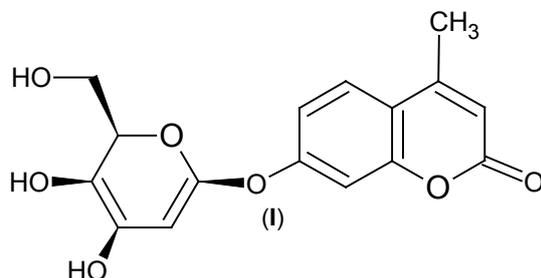
Pacientes y Métodos

La determinación de la actividad enzimática BGC humana se hace por ensayo fluorimétrico a tiempo final.

Las muestras se obtuvieron de los pacientes, bien del cordón umbilical, bien del talón del recién nacido (RN).

Veinte microlitros de suero humano se añaden a un medio de prueba con 0.2 M de citrato sódico con pH 6, y 5mM de 4 metil-umbeliferil-beta-d-glucopiranosido, de fórmula (I), para un volumen final de 0,1 ml. Se incuba la reacción a 37°C durante 30 minutos y se finaliza la reacción con adición de 2,9 ml de tampón amonio glicina 0,3M a pH 10,0.

5



10 La fluorescencia del producto, 4-metil umbeliferona, se mide en el fluorímetro con un filtro de excitación de 360nm y un filtro de emisión de 515 nm.

Cálculo de los valores normales y patológicos de la BGC humana

15 Los valores de la actividad beta-glucosidasa citosólica humana (BGC h) en 175 muestras de sangre de cordón umbilical, en el momento del nacimiento, para una población de RN sana (embarazo a término, con adecuada edad gestacional, controlado, sin patología perinatal, con Test de Apgar al minuto y 5 minutos superior a 9) presenta una media de 4.465 y desviación típica de 1.475

Los valores de de actividad BGC h en 100 muestras del talón del recién nacido, entre el 5º- 12º día de vida de RN sanos (embarazo a término, con adecuada edad gestacional, controlado, sin patología perinatal, con Test de Apgar al minuto y 5 minutos superior a 9) presenta una media de 4.470 y desviación típica de 4.108.

20 También se han calculado los valores de la actividad BGC h en función del peso en el momento del nacimiento. Así, los valores de actividad BGC h en el momento del nacimiento, en RN que no presentaron enterocolitis necrotizante (n=191), con peso al nacimiento de (Tabla 1):

PESOS NACIMIENTO (gramos)	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
500 a 749	16.507	8.95815
750 a 999	14.3502	7.22995
1000 a 1249	11.126	4.6993
1250 a 1499	11.7288	5.20301
1500 a 1999	8.6389	5.35625
2000 a 2499	8.774	6.47944
2500 a 3499	10.7259	9.73848
> de 3500	9.77329	9.25113

Tabla 1. valores de actividad BGC h distribuidos por peso en el momento del nacimiento, en RN que no presentaron enterocolitis necrotizante.

25 Por último, también se han calculado los valores de la actividad BGC h en función del peso en el momento del nacimiento. Así, los valores de actividad BGC h en RN que no presentaron enterocolitis necrotizante (n=187) de pendiendo del día de extracción de la muestra:

DÍAS DE VIDA A LA EXTRACCIÓN	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
Menos de 1 día	9.09	7.1760152
1º y 2º día	10.5	6.2231843
Del 3º al 7º día	12.8	7.0249956
Del 8º al 14º día	11	4.4136819
Del 15º al 28º día	13.6	5.7070673

Tabla 2. valores de actividad BGC h en RN que no presentaron enterocolitis necrotizante (n=187) de pendiendo del día de extracción de la muestra.

Resultados del t-test:

	BGC h			
	n	media	D.E	Significación estadística
Control	165	11,09	6,09	t = -8,16 p = <0,0001
E.C.N	13	27,91	15,60	

Nº (número de pacientes), D.E. (desviación estándar), I.C. 95% (intervalo de confianza al 95%)

Tabla 3. T-test.

REIVINDICACIONES

- 1- El uso de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento de las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos.
- 5 2- El uso de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante.
- 3- El uso de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es la enterocolitis necrotizante.
- 4- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, que comprende:
- 10 a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 b) determinar la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana en la muestra biológica aislada de (a).
- 5- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 15 6- Un método de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, que comprende los pasos (a) – (c) según las reivindicaciones 4-5, donde el aumento significativo por encima de la cantidad de referencia de la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana es diagnóstica de dicha enfermedad.
- 20 7- Un método de seguimiento de la evolución de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos, que comprende:
- a) tomar una muestra biológica aislada de un individuo,
 b) detectar la actividad de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana, en la muestra biológica aislada de (a).
 c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, y
- 25 d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo del paso (a), de manera no simultánea.
- 8- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal se selecciona de la lista que comprende: colitis isquémica, isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crónica y enterocolitis necrotizante.
- 30 9- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es la enterocolitis necrotizante.
- 10- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde el individuo del paso (a) es un neonato.
- 11- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde el individuo del paso (a) es un lactante.
- 35 12- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-11, donde la cantidad de referencia es 14 miliunidades de actividad enzimática beta-glucosidasa citosólica humana.
- 13- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-12, donde la cantidad de referencia es 15 miliunidades de actividad enzimática beta-glucosidasa citosólica humana.
- 14- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-13, donde la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es el suero.
- 40 15- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-14, donde la muestra biológica aislada se obtiene del cordón umbilical.
- 16- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-15, donde la muestra biológica aislada se obtiene del talón.
- 45 17- El método según cualquiera de las reivindicaciones 4-16, donde la actividad de la beta-glucosidasa citosólica se determina mediante análisis fluorométrico.

- 18- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar la actividad de la beta-glucosidasa citosólica humana.
- 19- Un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende 4 metil-umbeliferil-beta-d-glucopiranosido.
- 5 20- El uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal en humanos.
- 21- El uso del kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con necrosis isquémica intestinal es la enterocolitis necrotizante.

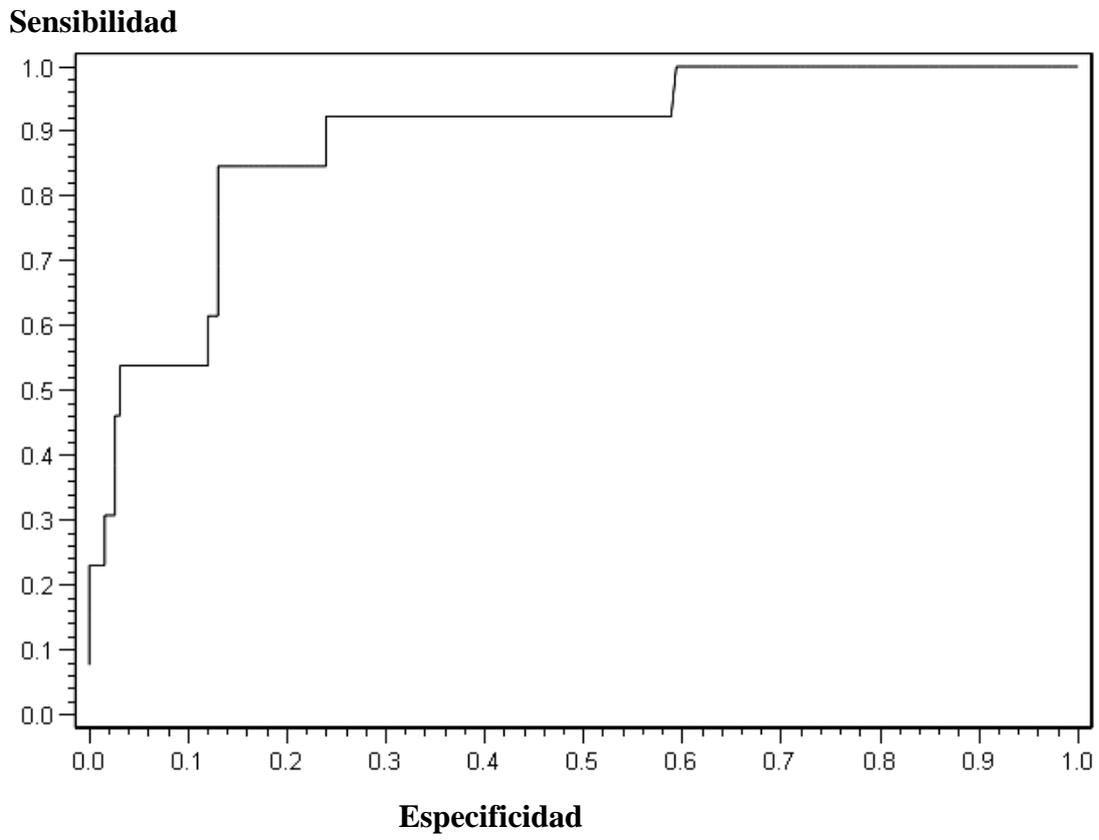


Fig. 1



Fig. 2

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Servicio Andaluz de Salud

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, y para evaluar la respuesta al tratamiento.

<130> P-04146

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Phe Pro Ala Gly Phe Gly Trp Ala Ala Ala Thr Ala Ala Tyr

1 5 10 15

Gln Val Glu Gly Gly Trp Asp Ala Asp Gly Lys Gly Pro Cys Val Trp

20 25 30

Asp Thr Phe Thr His Gln Gly Gly Glu Arg Val Phe Lys Asn Gln Thr

35 40 45

Gly Asp Val Ala Cys Gly Ser Tyr Thr Leu Trp Glu Glu Asp Leu Lys

50 55 60

Cys Ile Lys Gln Leu Gly Leu Thr His Tyr Arg Phe Ser Leu Ser Trp

65 70 75 80

Ser Arg Leu Leu Pro Asp Gly Thr Thr Gly Phe Ile Asn Gln Lys Gly

85 90 95

Ile Asp Tyr Tyr Asn Lys Ile Ile Asp Asp Leu Leu Lys Asn Gly Val

100 105 110

Thr Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Phe Asp Leu Pro Gln Thr Leu Glu

115 120 125

Asp Gln Gly Gly Trp Leu Ser Glu Ala Ile Ile Glu Ser Phe Asp Lys

130 135 140

Tyr Ala Gln Phe Cys Phe Ser Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Gln Trp

145 150 155 160

Ile Thr Ile Asn Glu Ala Asn Val Leu Ser Val Met Ser Tyr Asp Leu

165 170 175

Gly Met Phe Pro Pro Gly Ile Pro His Phe Gly Thr Gly Gly Tyr Gln

180 185 190

ES 2 385 583 A1

Ala Ala His Asn Leu Ile Lys Ala His Ala Arg Ser Trp His Ser Tyr
195 200 205

Asp Ser Leu Phe Arg Lys Lys Gln Lys Gly Met Val Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Phe Ala Val Trp Leu Glu Pro Ala Asp Pro Asn Ser Val Ser Asp Gln
225 230 235 240

Glu Ala Ala Lys Arg Ala Ile Thr Phe His Leu Asp Leu Phe Ala Lys
245 250 255

Pro Ile Phe Ile Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Val Val Lys Ser Gln Ile
260 265 270

Ala Ser Met Ser Gln Lys Gln Gly Tyr Pro Ser Ser Arg Leu Pro Glu
275 280 285

Phe Thr Glu Glu Glu Lys Lys Met Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe
290 295 300

Ala Val Gln Tyr Tyr Thr Thr Arg Leu Ile Lys Tyr Gln Glu Asn Lys
305 310 315 320

Lys Gly Glu Leu Gly Ile Leu Gln Asp Ala Glu Ile Glu Phe Phe Pro
325 330 335

Asp Pro Ser Trp Lys Asn Val Asp Trp Ile Tyr Val Val Pro Trp Gly
340 345 350

Val Cys Lys Leu Leu Lys Tyr Ile Lys Asp Thr Tyr Asn Asn Pro Val
355 360 365

Ile Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Phe Pro Gln Ser Asp Pro Ala Pro Leu
370 375 380

Asp Asp Thr Gln Arg Trp Glu Tyr Phe Arg Gln Thr Phe Gln Glu Leu
385 390 395 400

Phe Lys Ala Ile Gln Leu Asp Lys Val Asn Leu Gln Val Tyr Cys Ala
405 410 415

Trp Ser Leu Leu Asp Asn Phe Glu Trp Asn Gln Gly Tyr Ser Ser Arg
420 425 430

Phe Gly Leu Phe His Val Asp Phe Glu Asp Pro Ala Arg Pro Arg Val
435 440 445

Pro Tyr Thr Ser Ala Lys Glu Tyr Ala Lys Ile Ile Arg Asn Asn Gly
450 455 460

Leu Glu Ala His Leu
465

<210> 2

ES 2 385 583 A1

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Phe Pro Ala Gly Phe Gly Trp Ala Ala Ala Thr Ala Ala Tyr

1 5 10 15

Gln Val Glu Gly Gly Trp Asp Ala Asp Gly Lys Gly Pro Cys Val Trp

20 25 30

Asp Thr Phe Thr His Gln Gly Gly Glu Arg Val Phe Lys Asn Gln Thr

35 40 45

Gly Asp Val Ala Cys Gly Ser Tyr Thr Leu Trp Glu Glu Asp Leu Lys

50 55 60

Cys Ile Lys Gln Leu Gly Leu Thr His Tyr Arg Phe Ser Leu Ser Trp

65 70 75 80

Ser Arg Leu Leu Pro Asp Gly Thr Thr Gly Phe Ile Asn Gln Lys Ala

85 90 95

Ile Gln Leu Asp Lys Val Asn Leu Gln Val Tyr Cys Ala Trp Ser Leu

100 105 110

Leu Asp Asn Phe Glu Trp Asn Gln Gly Tyr Ser Ser Arg Phe Gly Leu

115 120 125

Phe His Val Asp Phe Glu Asp Pro Ala Arg Pro Arg Val Pro Tyr Thr

130 135 140

Ser Ala Lys Glu Tyr Ala Lys Ile Ile Arg Asn Asn Gly Leu Glu Ala

145 150 155 160

His Leu



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201032013

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	REED A. DIMMITT ET AL. "Serum cytosolic β -glucosidase activity in a rat model of necrotizing enterocolitis" Pediatric Research (octubre 2003) Vol. 54, N.º. 4, páginas 462 - 465; DOI 10.1203/01.PDR.0000081310.47579.49; todo el documento.	1-21
X	SHERI MORRIS ET AL. "Serum cytosolic β -glucosidase elevation and early ischemic injury to guinea pig small intestine" Surgery (febrero 1999) Vol. 125, N.º. 2, páginas 202 - 210; ISSN 0039-6060; DOI 10.1016/S0039-6060(99)70266-7; todo el documento.	1-21
A	MARION C. ET AL. "Current issues in the management of necrotizing enterocolitis" Seminars in Perinatology (junio 2004) Vol. 28, N.º. 3, páginas 221 - 233; todo el documento.	1-21
A	CHRISTOPHER YOUNG ET AL. "Biomarkers for infants at risk for necrotizing enterocolitis: clues to prevention" Pediatric Research (mayo 2009) Vol. 65, N.º. 5, páginas 91R - 97R; todo el documento.	1-21

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 n.º:

Fecha de realización del informe
09.05.2012

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/38 (2006.01)

C12Q1/34 (2006.01)

G01N33/573 (2006.01)

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

C12N, C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-21	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	REED A. DIMMITT ET AL. "Serum cytosolic β -glucosidase activity in a rat model of necrotizing enterocolitis" Pediatric Research (octubre 2003) Vol. 54, N°. 4, páginas 462 - 465; DOI 10.1203/01.PDR.0000081310.47579.49	Octubre 2003
D02	SHERI MORRIS ET AL. "Serum cytosolic β -glucosidase elevation and early ischemic injury to guinea pig small intestine" Surgery (febrero 1999) Vol. 125, N°. 2, páginas 202 - 210; ISSN 0039-6060; DOI 10.1016/S0039-6060(99)70266-7	Febrero 1999

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-21, es el uso de la enzima beta-glucosidasa citosólica humana (BGCh) para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal (reiv. 1-3). Otro objeto de la invención un método de obtención de datos, un método de diagnóstico y un método de seguimiento de la evolución de las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, basados todos ellos en la determinación de la actividad de la enzima BGCh (reiv. 4-17). Es también objeto de la invención un kit con los elementos necesarios para la determinación de la actividad de la BGCh, entre ellos el 4-metil-umbeliferil-beta-D-glucopiranosido, y su uso para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal (reiv. 18-21).

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) y Actividad Inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

El documento D01 divulga la relación entre la enzima beta-glucosidasa citosólica con la enterocolitis necrotizante en ratas, de forma que un aumento en la actividad de la enzima es diagnóstico de la enfermedad. Los autores de este documento miden la actividad de la enzima en suero mediante análisis fluorométrico, utilizando el 4-metil-umbeliferil-beta-D-glucopiranosido. Tomaron muestras de individuos sanos (valores de referencia), individuos levemente afectados por la enfermedad e individuos enfermos. Comparando los valores de la actividad de la enzima de los distintos grupos se observó que los valores de dicha actividad son mucho más elevados en los individuos enfermos que en el resto, y que un aumento de dichos valores precede a la enfermedad, haciendo de esta enzima un buen marcador de la enterocolitis necrotizante.

El documento D02 divulga la relación entre la enzima beta-glucosidasa citosólica con la necrosis isquémica intestinal en cobayas, de forma que un aumento en la actividad de la enzima es diagnóstico de la enfermedad. Los autores de este documento miden la actividad de la enzima en suero mediante análisis fluorométrico, utilizando el 4-metil-umbeliferil-beta-D-glucopiranosido. Tomaron muestras de individuos sanos (valores de referencia), individuos levemente afectados por la enfermedad e individuos enfermos. Comparando los valores de la actividad de la enzima de los distintos grupos se observó que los valores de dicha actividad son mucho más elevados en los individuos enfermos que en el resto, y que un aumento de dichos valores precede a la enfermedad, haciendo de esta enzima un buen marcador de la isquemia mesentérica.

Existen varias diferencias entre los documentos D01 y D02 del estado de la técnica y el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-21. La primera diferencia es la enzima BGC. En la solicitud, la BGC es humana y en los documentos D01 y D02 es, en un caso de rata, y en el otro de cobaya. Para un experto en la materia, y a partir de lo divulgado en el estado de la técnica, sería obvio utilizar la BGCh para el diagnóstico de las enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, tal y como se sugiere en los documentos D01 y D02 en humanos, y tener unas expectativas razonables de éxito.

Otra diferencia entre los documentos D01 y D02 del estado de la técnica y el objeto de la invención son las cantidades de referencia de la actividad enzimática, al igual que el "lugar" de donde se obtienen las muestras biológicas de las que se obtiene el suero a analizar. Sin embargo, estas diferencias no suponen una ventaja técnica respecto a lo ya conocido. En la memoria de la solicitud no se justifica que las cantidades de referencia reivindicadas supongan una ventaja técnica, sino que son únicamente para establecer un patrón de referencia. En el caso de que la muestra se tome en talón o en el cordón umbilical, tampoco es relevante para la invención, puesto que en la memoria no se indica que suponga una ventaja técnica, ya que la muestra que se analiza es el suero, independientemente de donde se tome la muestra.

Por lo tanto, a partir de los documentos del estado de la técnica, resultaría obvio para un experto en la materia, utilizar la BGCh para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de enfermedades que cursan con necrosis isquémica intestinal, midiendo la actividad de dicha enzima en suero, y comparando los datos obtenidos con un patrón de referencia, tal y como se divulga en los documentos D01 y D02.

En consecuencia, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-14, aunque cumple con el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 LP 11/1986, no implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 LP 11/1986.