

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 962**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2003 E 03708103 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.11.2004 EP 1474689**

54 Título: **Método de diagnóstico de enfermedades inflamatorias usando calgranulina C**

30 Prioridad:

15.02.2002 US 77600

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2013

73 Titular/es:

**WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER (100.0%)
Schlossplatz 2
48149 Münster, DE**

72 Inventor/es:

**SORG, CLEMENS y
ROTH, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 962 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

Método de diagnóstico de enfermedades inflamatorias usando calgranulina C

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar enfermedades inflamatorias, particularmente para diagnosticar estadios específicos de enfermedades inflamatorias y/o para determinar el riesgo de recaída y/o para discriminar entre enfermedades con síntomas similares basándose en el marcador CALGRANULINA C.

Antecedentes de la invención

10 Muchas enfermedades se caracterizan por síntomas de inflamación (enfermedades inflamatorias). Un indicio es la presencia de células inflamatorias tales como neutrófilos y macrófagos en sitios locales de inflamación. El estado inflamatorio también puede ser sistémico, es decir, las proteínas secretadas por células inflamatorias pueden detectarse en el suero sanguíneo.

15 A pesar de antecedentes patógenos diferentes o muy frecuentemente desconocidos, los síntomas tempranos de las enfermedades inflamatorias pueden ser muy similares; por ejemplo la fiebre es un síntoma muy común de enfermedades inflamatorias agudas. Las causas conocidas de las enfermedades inflamatorias son reacciones autoinmunitarias, infecciones bacterianas, virales o parasitarias, trastornos genéticos, alergias. En muchos casos, se han propuesto mezclas de éstas u otras causas, por ejemplo para la enfermedad muy común psoriasis, que se caracteriza por inflamación de la epidermis. En algunos casos de pacientes con psoriasis, también puede verse afectado el sistema locomotor dando como resultado artritis psoriásica. Especialmente las articulaciones se ven afectadas por una fuerte inflamación en esta enfermedad, dando como resultado finalmente rigidez.
20 Presumiblemente, esta enfermedad se caracteriza por estar provocada por múltiples factores tales como predisposición genética, estrés psicológico o irritación de la piel.

25 Las diferentes formas de artritis inflamatoria crónica comprenden un grupo heterogéneo de trastornos clínicamente relevantes que afectan a tejidos mesenquimales generales. Esto conduce a una grave destrucción del tejido articular, dando como resultado daño en cartílago y hueso, y contribuyendo a un alto grado de discapacidad entre los pacientes. La inflamación del tejido sinovial es una característica común de la enfermedad articular periférica en artritis reumatoide. La inflamación sinovial o "sinovitis" se caracteriza por hiperplasia de la capa de revestimiento e infiltración celular e hipervascularización de la capa de subrevestimiento. Además de los linfocitos-T, los fagocitos tienen un papel crucial en la patogenia de la inflamación sinovial mediante la secreción de diversas citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas (Bresnihan & Tak, 1999, Res Clin Rheumatol 13: 645-659). Las exacerbaciones agudas son características de la artritis reumatoide. La etiología está en su mayor parte poco clara, pero se sugiere un antecedente de enfermedad autoinmunitaria.
30

35 En niños, la artritis reumatoide juvenil (ARJ), también denominada artritis crónica juvenil (ACJ) o artritis idiopática juvenil (AIJ), es la enfermedad autoinmunitaria reumática más frecuente. Se ven afectados niños de hasta 16 años. Entre el grupo de diferentes formas de ARJ, la artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico (ARJS) o enfermedad de Still es la forma más grave y peligrosa. La ARJS se caracteriza por una reacción inflamatoria sistémica que implica varios sistemas de órganos, por ejemplo bazo, hígado, ganglios linfáticos, médula ósea y piel. Durante el transcurso adicional de esta enfermedad, los pacientes desarrollan una artritis grave que a menudo es resistente a la terapia antiinflamatoria. La patogenia de este trastorno es completamente desconocida. Pacientes con ARJS no muestran rasgos inmunológicos característicos en la presentación inicial sino más bien una activación general de su sistema inmunitario innato, por ejemplo trombocitosis, neutrofilia y activación del sistema del complemento. Este patrón inflamatorio inespecífico es el responsable de las dificultades con respecto al diagnóstico temprano, especialmente con respecto a la discriminación de infecciones bacterianas. El hecho de que la ARJS se asemeje a infecciones bacterianas en los síntomas tempranos y que no existan marcadores de diagnóstico fiables, hace además muy difícil elegir la medicación correcta muy temprano.
40

45 Una regulación exacta del tratamiento de las diferentes formas de ARJ mediante administración de sustancias antiinflamatorias sólo puede llevarse a cabo de manera insuficiente hasta la fecha. La patogenia de las diferentes formas de enfermedad está en su mayor parte poco clara y, por tanto, la terapia no puede dirigirse a una diana específica. Especialmente, el criterio de valoración del tratamiento representa un problema principal en la medicación: aproximadamente el 50% de los pacientes con ARJ recaen tras la retirada del tratamiento con metotrexato (MTX) (Ravelli *et al.*, 1995, J Rheumatol 22: 1574). Varios autores han propuesto por tanto tratar a los pacientes con ARJ con inmunosupresores durante varios años incluso tras la remisión clínica. Hasta la fecha, no existen parámetros fiables para determinar rápida y sensiblemente la actividad inflamatoria residual de enfermedades de artritis reumatoide con el fin de excluir el riesgo de recaída. Parámetros inflamatorios comunes tales como proteína C reactiva (CRP) o velocidad de sedimentación globular (VSG) carecen de especificidad y sensibilidad (Giannini y Brewer, 1987, Clin Rheumatol 6:197). Los índices internacionalmente aceptados para determinar la actividad de la enfermedad se basan en su mayoría en criterios clínicos (Giannini y Brewer, citado anteriormente). Esta observación inadecuada de la actividad de la enfermedad da como resultado un tratamiento fijo
50
55

de los pacientes con inmunosupresores dando como resultado efectos secundarios graves (Giannini y Cassidy, 1993, *Drug Saf* 9: 325).

5 La artritis psoriásica habitualmente no es tan destructiva como la artritis reumatoide, lo que puede deberse a la menor infiltración sinovial de macrófagos con una producción inferior posterior de citocinas proinflamatorias (Veale *et al.*, 1993, *Arthritis Rheum* 36: 893-900; Danning *et al.*, 2000, *Arthritis Rheum* 43: 1244-1256). No obstante, frecuentemente están presentes neutrófilos en sinovitis en la artritis psoriásica y se ha notificado una regulación por incremento generalizada de la migración de neutrófilos y secreción de enzimas lisosomales en pacientes con artritis psoriásica (Biasi *et al.*, 1998, *Inflammation* 22: 533-543; Mikulikova *et al.*, 1984, *Clin Rheumatol* 3: 515-519; Sedgwick *et al.*, 1980, *J Invest Dermatol* 74: 81-84). Además, el crecimiento y la función vascular alteradas probablemente debido a una activación endotelial peculiar parecen desempeñar un papel principal en la sinovitis en la artritis psoriásica (Reece *et al.*, 1999, *Arthritis Rheum* 42: 1481-1484; Fearon *et al.*, 1999, *Ann NY Acad Sci* 878: 619-621). Están presentes citocinas-Th1, monocinas y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el sinovio en la artritis psoriásica y se ha sugerido que promueven la angiogénesis en lesiones cutáneas psoriásicas (Fraser *et al.*, 1991, *Arthritis-Rheum* 44: 2024-2028; Lowe *et al.*, 1995, *Br J Dermatol* 132: 497-505). Sin embargo, la expresión sinovial de citocinas en la artritis psoriásica apenas se ha caracterizado. (Ritchlin *et al.*, 1998, *J Rheumatol* 25: 1544-1552).

20 La enfermedad de Kawasaki, por otro lado, es una enfermedad aguda asociada con fiebre y en la que se ven afectados múltiples órganos. Es de lejos la vasculitis sistémica más común en la infancia. Los niños y niñas menores de 1 año y los niños corren un riesgo especial de enfermedad mortal debido a anomalías de las arterias coronarias. Sin embargo, la etiología es en gran parte desconocida, aunque las pruebas apuntan a una enfermedad autoinmunitaria en la que se ven afectados neutrófilos y células endoteliales. La vasculitis, en particular la enfermedad de Kawasaki, es un proceso necrotizante que afecta predominantemente a arterias de tamaño pequeño y medio. La etiología y patogenia de la vasculitis, en particular de la enfermedad de Kawasaki, sigue estando poco clara. Puede caracterizarse de la mejor manera mediante una estimulación generalizada de respuestas inflamatorias, posiblemente debido a superantígenos. La identificación de un marcador fiable para el diagnóstico del estadio de la enfermedad y la identificación de pacientes con un riesgo aumentado de complicación cardíaca sería ventajosa para el tratamiento adecuado de los pacientes.

30 La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad provocada por alteraciones genéticas, siendo la enfermedad letal heredada más común entre las personas de raza caucásica con una incidencia estimada de 1:3.400 nacidos vivos. Mutaciones en el regulador de conductancia transmembrana de la FQ (CFTR) conducen a un transporte de Cl⁻ defectuoso en el epitelio respiratorio dando como resultado una disminución de la eliminación de mucosidad. La consecuencia es una producción de mucosidad potenciada, inflamación crónica de las vías respiratorias, infecciones recurrentes y mecanismos de defensa del huésped alterados. La inflamación crónica de las vías respiratorias es la causa principal de morbilidad. Las infecciones pulmonares con una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo cepas atípicas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, representan un gran número de complicaciones. La inflamación neutrofílica se produce de manera temprana en la vida y contribuye a cambios tisulares progresivos. Las exacerbaciones agudas son un motivo común para la hospitalización y la terapia con antibióticos. Debido al alto nivel de inflamación crónica, es muy difícil diagnosticar exacerbaciones inflamatorias agudas debido a por ejemplo infecciones bacterianas adquiridas. Con el fin de garantizar un tratamiento adecuado de esta grave enfermedad (sólo el 80% de los pacientes alcanzan los 19 años de edad o más), el diagnóstico temprano es un requisito previo.

45 Uno de los problemas principales radica en el diagnóstico de exacerbaciones agudas en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias crónicas, en particular FQ. Una de las tareas principales para los médicos en la FQ es ajustar la terapia a las complicaciones pulmonares agudas de la inflamación crónica. La identificación de exacerbaciones infecciosas agudas se basa en la experiencia clínica, dependiendo más bien de impresiones subjetivas que del uso de parámetros objetivos. Falta consenso sobre los criterios para definir episodios agudos. Los parámetros convencionales usados normalmente para identificar infecciones agudas, por ejemplo fiebre, leucocitosis, CRP, VSG, deterioro de la función pulmonar y cultivos de esputo, no siempre son de ayuda. La cronicidad de la enfermedad pulmonar junto con infecciones respiratorias agudas de presentación atípica generan problemas importantes a los médicos que tratan con la FQ. Sería de ayuda tener marcadores más fiables que indiquen infecciones para monitorizar la enfermedad y guiar la terapia. Los marcadores sensibles ideales indican procesos bronquiales locales antes de que se produzcan respuestas sistémicas.

55 El intento de encontrar marcadores séricos más fiables para las exacerbaciones se llevó a cabo repetidamente en el pasado. CRP o VSG han dejado de ser generalmente útiles en las exacerbaciones de FQ (Watkin *et al.*, 1994, *Pediatr Pulmonol* 17: 6-10). Posibles marcadores más sofisticados, tales como interleucinas o factor de necrosis tumoral (TNF), no se consideran herramientas útiles por todos los investigadores (véase por ejemplo Wolter *et al.*, 1999, *Immunol* 6: 260-5). Eichler *et al.* propusieron la lipocalina neutrofílica humana como marcador para las exacerbaciones de CF (1999, *Eur Respir J* 14: 1145-9). Pueden detectarse niveles de diversas citocinas en esputos, pero analizar esputos es muy crítico (véase por ejemplo Karpati *et al.*, 2000, *Scand J Infect Dis* 32: 75-9). Un examen fiable requiere a menudo lavado broncoalveolar (Smith *et al.*, 1988, *J Pediatr* 112: 547-54). Se ha mostrado que el óxido nítrico exhalado no es de ayuda en FQ (Grasemann *et al.*, 1998, *Arch Dis Child* 78: 49-53).

También la etiología y patogenia de la enfermedad inflamatoria del intestino (o intestinal) crónica tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa apenas se entiende todavía. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la fisiopatología, que oscilan desde alteraciones genéticas, respuesta inmunitaria desregulada frente a constituyentes de la flora intestinal normal o eliminación infructuosa de antígenos desconocidos (Sator, 1997, Am J Gastroenterol 92: 5S-11S). A pesar de las diferencias obvias en los mecanismos de inicio, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa comparten aberraciones inmunológicas comunes que constituyen un estado de procesos inflamatorios en curso (Brandzaeg *et al.*, 1997, Springer Semin Immunopathol 18: 555-589). Una de las características histológicas prominentes que se observa en la colitis ulcerosa así como en la enfermedad de Crohn es la infiltración de neutrófilos en la mucosa inflamada en un punto de tiempo temprano de la inflamación (Nikolaus *et al.*, 1998, Gut 42: 470-476; Kucharzik *et al.*, 2001, Am J Pathol 159: 2001-2009). La actividad de enfermedad en la enfermedad intestinal inflamatoria está ligada a un flujo de entrada de neutrófilos a la mucosa y posteriormente a la luz intestinal dando como resultado la formación de los denominados abscesos crípticos. La migración de neutrófilos a través de los epitelios intestinales induce la apertura transitoria de las uniones intercelulares, pero no provoca habitualmente discontinuidades morfológicas. (Nusrat *et al.*, 1997, Gastroenterology 113: 1489-1500). Uno de los posibles mediadores que se ha sugerido que induce la infiltración de neutrófilos durante el proceso inflamatorio de la enfermedad intestinal inflamatoria es la interleucina-8 (IL-8) derivada del epitelio (Imada *et al.*, 2001, Scand J Gastroenterol 36: 854-864; McCormick *et al.*, 1995, J Cell Biol 131: 1599-1608). Los neutrófilos activados secretan una variedad de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, y de ese modo desencadenan la infiltración de diversas células inflamatorias incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos y granulocitos (Burgio *et al.*, 1995, Gastroenterology 109: 1029-1038; Reinecker *et al.*, 1993, Clin Exp Immunol 94: 174-181; Mazlam *et al.*, 1994, Gut 35: 77-83; MacDermott *et al.*, 1998, Inflamm Bowel Dis 4: 54-67). Uno de los mediadores más importantes durante el proceso inflamatorio de la enfermedad intestinal inflamatoria es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) que se expresa en la mucosa intestinal de los pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (Murch, 1998, Nutrition 14: 780-783; Breese *et al.*, 1994, Gastroenterology 106: 1455-1466). TNF alfa desencadena la inflamación por medio de una cascada de señalización dependiente de factor nuclear kappa B (NF-kappa B) intracelular. NF-kappa B desempeña un papel clave para los procesos posteriores en la inflamación crónica tal como enfermedad intestinal inflamatoria mediante el control de la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias (Baldwin, 1996, Annu Rev Immunol 14: 649-683; Rogler *et al.*, 1998, Gastroenterology 115: 357-369). Un programa terapéutico reciente para tratar la enfermedad de Crohn activa implica la administración de agentes bloqueantes de TNF tales como anticuerpos anti-TNF, por ejemplo infliximab.

El diagnóstico de la actividad de enfermedad de enfermedades intestinales inflamatorias, especialmente la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, se evalúa principalmente usando observaciones clínicas, por ejemplo el bienestar general. Por tanto, hay una necesidad de marcadores biológicos sensibles y fiables para la actividad de enfermedad con el fin de evaluar de manera fiable la actividad de enfermedad; sin embargo, los marcadores biológicos sometidos a prueba hasta la fecha, tales como CRP; VSG, recuentos de plaquetas y de leucocitos, no se encontró que fueran adecuados (Nielsen *et al.*, 2000, Am J Gastroenterol 95:1849-1850).

La CALGRANULINA C humana, que también se denomina S100A12, EN-RAGE, CAAF1 y proteína p6, es una proteína pequeña de 92 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas S100 de unión a calcio (Guignard *et al.*, 1995, Biochem J 309: 395-401; documento US 5.976.832). Se conocen homólogos de CALGRANULINA C en otras especies de *Bos taurus* (documento US 5.976.832), cerdo (Dell'Angelica, 1994, J Biol Chem 269: 28929-28936) y conejo (secuencia parcial: Yang *et al.*, 1996, J Biol Chem 271: 19802-19809). Como otras proteínas S100, se ha propuesto que desempeña un papel en la inflamación general, aunque el papel en la inflamación dentro de la familia S100 es contradictorio porque algunas de ellas inhiben la función de células inflamatorias mientras que otras la activan. Se ha propuesto que la CALGRANULINA C desempeña un papel proinflamatorio (Donato, 2001, Int J Biochem Cell Biol 33: 637-668; Donato, 1999, Biochim Biophys Acta, 81450:191-231; Yang *et al.*, 2001, J Leukoc Biol 69: 986-994). Las proteínas S100 se acumulan en sitios de inflamación, y se encuentran altos niveles de S100A8 (también denominado proteína 8 mieloides-relacionada, MRP8 o calgranulina A) y S100A9 (MRP14 o calgranulina B) en enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, y FQ (Golden *et al.*, 1996, Arch Dis Child 74: 136-9; Frosch *et al.*, 2000, Arthritis Rheum 43: 628-37; Roth *et al.*, 2001, Lancet 357:1041). Se detectó sobreexpresión de S100A8 murina en un modelo de ratón de FQ (Thomas *et al.*, 2000, J Immunol 164: 3870-3877).

La CALGRANULINA C se expresa por granulocitos, mientras que su expresión por monocitos sigue siendo controvertida (Vogl *et al.*, 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296; Hofmann *et al.* 1999, Cell 97: 889-901; Yang *et al.*, 2001, J Leukoc Biol 69: 986-994; Robinson *et al.*, 2000, Biochem Biophys Res Commun 275: 865-870). Se secreta por granulocitos activados (Boussac *et al.*, 2000, Electrophoresis 21: 665-672). Sus funciones extracelulares incluyen actividad quimiotáctica potente comparable a otros agentes fuertemente quimiotácticos (Hofmann *et al.* 1999, Cell 97: 889-901; Miranda *et al.*, 2001, FEBS Lett 488: 85-90). La CALGRANULINA C es un ligando para el receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) expresado en macrófagos, linfocitos y endotelio (Hofmann *et al.* 1999, Cell 97: 889-901). La señalización intracelular por medio de proteína cinasas induce secreción dependiente del factor nuclear (NF)-kappa B de diferentes citocinas (Yeh *et al.*, 2001, Diabetes 50: 1495-1504; Lander *et al.*, 1997, J Biol Chem 272: 17810-17814). NF-kappa B desempeña un papel central en la patogenia de la sinovitis en la artritis reumatoide y la artritis psoriásica (Danning *et al.*, 2000, Arthritis Rheum 43: 1244-1256) Por tanto, la CALGRANULINA C es la primera proteína S100 para la que se ha descrito un modelo de receptor

convinciente. Se ha propuesto el nombre EN-RAGE (para proteína de unión a RAGE recién identificada extracelular) para enfatizar su papel central en una ruta de señalización mediada por receptor, que podría ofrecer dianas atractivas para la intervención con agentes bloqueantes.

5 Las proteínas implicadas directa o indirectamente en algunos procesos inflamatorios son muy comunes. Sin embargo, hay una necesidad de marcadores de diagnóstico que sean específicos, con el fin de discriminar entre enfermedades con síntomas similares, especialmente ARJS e infecciones bacterianas, de monitorizar estadios de la enfermedad para lograr un tratamiento adecuado, especialmente vasculitis, en particular la enfermedad de Kawasaki y CF, y de determinar el riesgo de recaída de una determinada enfermedad, especialmente ARJ, para determinar de nuevo el tratamiento apropiado. En particular, el diagnóstico del estado de la enfermedad mediante la identificación de exacerbaciones agudas en enfermedades inflamatorias crónicas, especialmente exacerbación aguda de FQ y el diagnóstico del estado de la enfermedad mediante la identificación de subpoblaciones de pacientes, especialmente subpoblaciones de vasculitis, en particular de pacientes con enfermedad de Kawasaki con problemas de arterias coronarias, permitiría el tratamiento adecuado de estas enfermedades.

15 El documento WO 01/86002 se refiere un métodos para detectar y caracterizar psoriasis. Se proporciona una variedad de marcadores, en los que cambios en los niveles de expresión de estos marcadores se correlacionan con la presencia de psoriasis.

El documento EP 0 731 166 se refiere a calgranulina C así como a métodos para su producción.

Zheng Yang *et al* (J. Leukoc. Biol, vol 69, n.º 6, junio de 2001, páginas 986-994) describen un estudio funcional sobre calgranulina C, que se encontró en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

20 Por tanto, hay una necesidad de una herramienta de diagnóstico fiable especialmente en los estadios tempranos de una exacerbación inflamatoria aguda y/o para determinar el riesgo de recaída y/o para discriminar entre enfermedades con síntomas similares con el fin de aplicar una medicación apropiada.

25 Por tanto, es un objeto principal de la presente invención proporcionar un nuevo método para diagnosticar enfermedades inflamatorias mediante el uso de un marcador fiable de inflamación, particularmente para diagnosticar estadios específicos de enfermedades inflamatorias y/o para determinar el riesgo de recaída y/o para discriminar entre enfermedades con síntomas similares con el fin de aplicar una medicación apropiada.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona un método para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias seleccionadas de artritis reumatoide, artritis seronegativa, artritis juvenil y artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico (ARJS), que comprende las etapas de

a) determinar la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C en una muestra de suero de un paciente; y

b) comparar la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C determinada en dicha muestra de suero con la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C determinada en una muestra control de suero,

35 en el que un aumento en la cantidad de polipéptido de calgranulina C en la muestra de suero en comparación con la muestra control es indicativo de dicha enfermedad.

Se describen realizaciones adicionales de la presente invención en las reivindicaciones dependientes 2 a 7.

40 Se determina la cantidad y/o concentración de polipéptido de CALGRANULINA C presente en dicha muestra de suero. Esta determinación puede lograrse por medio de una de varias técnicas incluyendo pero sin limitarse de ninguna manera a: (i) inmunohistoquímica de la muestra de suero utilizando anticuerpos dirigidos a proteína(s) de CALGRANULINA C; (ii) medición cuantitativa de proteínas de CALGRANULINA C en la muestra de suero; (ii) medición de las proteínas de CALGRANULINA C en suero.

45 Aún en otro método preferido según la invención, se usa un anticuerpo específico para determinar la cantidad y/o la concentración de polipéptido de CALGRANULINA C. Preferiblemente, dicho anticuerpo específico reconoce un epítipo derivado de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2. La generación de anticuerpos y la determinación de epítopos se conocen bien por un experto en la técnica y pueden encontrarse en la bibliografía de libros de texto convencional en este campo técnico. Preferiblemente, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que comprende antisuero policlonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla y diacuerpos. Incluso más preferiblemente, dicho anticuerpo se usa para llevar a cabo un inmunoensayo, tal como un inmunoensayo enzimático (EIA), por ejemplo ELISA, o un método inmunohistoquímico.

50 En un método particularmente preferido, las moléculas de CALGRANULINA C diana en la muestra de suero se exponen a un anticuerpo específico que puede estar marcado o no con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y de la fuerza de la señal de la molécula indicadora, puede detectarse una diana unida mediante marcaje directo con un anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer

anticuerpo, se expone al complejo de diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. Se detecta el complejo mediante la señal emitida por la molécula indicadora.

Por "molécula indicadora", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, quiere decirse una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. La detección puede ser o bien cualitativa o bien cuantitativa. Las moléculas indicadoras usadas más comúnmente en este tipo de ensayo son o bien enzimas, fluoróforos o bien moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

En el caso de un EIA, se conjuga una enzima con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Tal como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. Las enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa del rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que proporcionen un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al complejo primer anticuerpo-hapteno, se deja que se una, y entonces se elimina por lavado el exceso de reactivo. Entonces se añade una disolución que contiene el sustrato apropiado al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima unida al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que adicionalmente puede cuantificarse, habitualmente de manera espectrofotométrica, para dar una indicación de la cantidad de hapteno que estaba presente en la muestra.

Alternativamente, compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por emisión de la luz a una longitud de onda característica detectable visualmente con un microscopio óptico. Como en el EIA, se deja que el anticuerpo marcado fluorescente se una al complejo del primer anticuerpo-hapteno. Tras eliminar por lavado el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone entonces a la luz de la longitud de onda apropiada y la fluorescencia observada indica la presencia del hapteno de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy bien establecidas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

Finalmente, es posible llevar a cabo un análisis de la expresión de CALGRANULINA C mediante escisión proteolítica de la proteína, por ejemplo usando una proteasa y análisis posterior mediante espectroscopía de masas, por ejemplo MALDI-TOF. Tales métodos también los conoce bien el experto en la técnica.

Como siguiente etapa, la cantidad y/o concentración de polipéptido de CALGRANULINA C determinada en dicha muestra de suero se compara con la cantidad y/o concentración de polipéptido de CALGRANULINA C determinada en una muestra control. Tal comparación se basará en la información obtenida en la anterior determinación de la cantidad y/o concentración de CALGRANULINA C. Los datos o la información pueden presentarse tanto en forma escrita como electrónica, es decir, en un medio de almacenamiento adecuado. La comparación puede llevarse a cabo manual e individualmente, es decir, visualmente por el médico encargado o el científico en el centro de diagnóstico, o realizarse por una máquina adecuada, como un ordenador equipado con un software adecuado. Se prefiere tal equipo para el examen de rutina, por ejemplo en una unidad de cuidados intensivos de un hospital. El experto en la técnica conoce entornos de alto rendimiento (es decir, unidades) y también se describen en la bibliografía convencional.

Como etapa opcional, pueden determinarse las cantidades y/o concentraciones de al menos un polipéptido marcador inflamatorio convencional y/o ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido presente en dicha muestra de suero y en dicha muestra control.

Por "marcador convencional" o "marcador inflamatorio convencional" tal como se usa en la presente memoria descriptiva quiere decirse un marcador distinto de CALGRANULINA C que se induce en el transcurso de una enfermedad inflamatoria. Según un método preferido según la presente invención, dicho marcador inflamatorio convencional se selecciona del grupo que consiste en CRP, lipocalina neutrofílica humana, VSG, receptores solubles, por ejemplo Fas, y citocinas. Tales marcadores convencional proporcionan una información de "más/menos" o "inflamación-sí/no" sencilla con respecto a una inflamación. Para el fin de la presente invención, estos marcadores proporcionan tanto un control interno como un punto fijo en el tiempo, en el que la inflamación, por ejemplo, está presente y es aguda. La comparación de CALGRANULINA C con el marcador convencional y/o la expresión en la muestra control proporcionarían por tanto información viable adicional para el diagnóstico, la monitorización, el tratamiento y especialmente para la prevención de una enfermedad inflamatoria.

Durante los experimentos llevados a cabo en el transcurso de la terminación de la presente invención, los inventores encontraron que la CALGRANULINA C puede usarse como marcador inflamatorio temprano, cuya inducción (o comienzo) se produce mucho antes y en una magnitud extraordinariamente alta en contraposición a otros

marcadores convencionales. Esto permite un diagnóstico mucho más temprano y por tanto más eficaz de los estadios de enfermedades inflamatorias y, a su vez, un tratamiento mucho más temprano, eficaz y que requiere menos tiempo de enfermedades inflamatorias. El uso del marcador de la invención, y en particular en conexión con un marcador inflamatorio convencional, aumenta la comodidad para los pacientes que experimentan la inflamación.

5 Además, la alta inducción proporciona un diagnóstico claro y por tanto una monitorización muy precisa de los estadios de enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias que pueden seguirse de manera diagnóstica son artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico (ARJS, enfermedad de Still).

10 Por “estadios de enfermedades inflamatorias” o “estadios de enfermedades” tal como se usa en la presente memoria descriptiva se quiere decirse las diferentes fases del transcurso de una enfermedad inflamatoria. Tales fases incluyen la fase temprana, aguda y regresiva durante el periodo de tiempo durante el que un paciente experimenta dicha enfermedad. Los estadios de una enfermedad incluyen también una exacerbación de una enfermedad presente, infecciones secundarias a una enfermedad ya existente, una inflamación aguda sobre el antecedente de una inflamación crónica, una infección adquirida en el antecedente de una enfermedad inflamatoria crónica, el riesgo de recaída, y/o la discriminación entre enfermedades con síntomas similares.

15 Por tanto, en un aspecto del método según la presente invención, la enfermedad inflamatoria es una infección adquirida en el antecedente de una enfermedad inflamatoria crónica. Aún en otro aspecto del método según la presente invención, la enfermedad inflamatoria es una exacerbación de una enfermedad ya presente.

Preferiblemente, el método según la presente invención se usa para determinar el riesgo de recaída y/o para discriminar entre enfermedades con síntomas similares.

20 Los estadios de enfermedades en general, y en particular enfermedades inflamatorias; se diagnostican frecuentemente basándose en síntomas clínicos que se observan por el médico encargado. Basándose en el diagnóstico, se evalúa el estadio (en la mayoría de los casos correspondiente a la gravedad de la enfermedad). No obstante, además del diagnóstico “clásico”, que habitualmente se basa en la inspección visual y marcadores de inflamación sanguíneos convencionales, en diagnóstico reciente, el análisis de marcadores inflamatorios se ha convertido en una herramienta adicional para el análisis de los estadios de enfermedades inflamatorias. Un marcador convencional prominente de esta familia de marcadores adecuados para el diagnóstico es la proteína C reactiva (CRP). No obstante, este marcador es bastante lento en su respuesta a una inflamación y no se induce en todos los casos en una razón muy alta, en comparación con su expresión sin inflamación. Por ejemplo, los estadios de una enfermedad pueden designarse como brote agudo, exacerbación, alivio e incluyen fiebre y otros síntomas.

25 Además, la presente invención permite el diagnóstico de una enfermedad incluso en pacientes que muestran un aspecto sano, pero que tienen un riesgo de recaída de una enfermedad. Por el término “recaída” quiere decirse que en contraposición a un paciente “virgen” para la infección, la persona ya había experimentado al menos un estadio de la respectiva enfermedad inflamatoria. Esto incluye también la distinción entre enfermedades que se experimentaron y recién adquiridas.

35 Un ejemplo para el análisis y la clasificación de los estadios de una enfermedad se describe en el presente documento (de una manera no limitada) en el caso de la artritis reumatoide. La artritis reumatoide puede durar muchos años. La progresión (es decir, estadios o fases) de la enfermedad se clasifica mediante cinco estadios diferentes de desarrollo. Estadio I: No experimentará ninguno de los signos o síntomas comunes, aunque puede tener una enfermedad similar a la gripe. Estadio II: Experimenta dolor leve e hinchazón en articulaciones pequeñas tales como manos, muñecas, rodillas y pies. También puede experimentar un malestar físico general, continuado.

40 Rayos X de las articulaciones aparecerán normales en este estadio. Estadio III: Las articulaciones afectadas están calientes e hinchadas. También experimenta rigidez por la mañana, una limitación de la movilidad en las articulaciones afectadas y malestar físico general y continuado y debilidad. Estadio IV: Los síntomas que experimentó en el estadio III se volverán más pronunciados. Estadio V: Los síntomas están más pronunciados que en el estadio IV. Muy probablemente experimentará la pérdida de función de las articulaciones afectadas. A menudo se produce deformidad. Durante este estadio de la enfermedad, el hueso alrededor de la articulación se erosiona y los ligamentos se estiran. También, pueden producirse complicaciones adicionales tales como rotura de tendones, úlceras en las piernas, síndrome de Sjögren y síndrome del túnel carpiano.

45 Aún en otro aspecto de la presente invención, el método según la presente invención que comprende determinar la cantidad y/o la concentración de polipéptido de CALGRANULINA C implica determinar la cantidad y/o la concentración de polipéptido de CALGRANULINA C como marcador local. Por “marcador local” tal como se usa en la presente memoria descriptiva quiere decirse un marcador que se produce directamente en el sitio de la enfermedad inflamatoria. Por tanto, un marcador local contrasta con marcadores convencionales que se producen como una respuesta general a una infección y/o estímulo inflamatorio. Tales marcadores incluyen, entre otros, CRP, lipocalina neutrofílica humana, VSG, receptores solubles como Fas, y citocinas. En cambio, puede mostrarse CALGRANULINA C en el líquido sinovial, lo que indica su producción localizada. Los marcadores locales tienen ventajas particulares en el análisis de una posible recaída de una enfermedad, tal como puede mostrarse en el presente caso con pacientes con ARJ que parecían estar sanos, aún teniendo un riesgo aumentado de recaída para dicha enfermedad. No obstante, el uso de CALGRANULINA C como marcador no debe limitarse a inflamaciones

locales, ya que este marcador (aunque en un punto en el tiempo ligeramente posterior) también está presente en, por ejemplo, el suero de los pacientes.

5 Tal como se mencionó anteriormente, el método de la presente invención puede formar la base para un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto (es decir un mamífero) que lo necesita. Por tanto, se describe un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un mamífero que lo necesita, que comprende las etapas de: a) llevar a cabo las etapas a) a c) según el método de la presente invención tal como se indicó anteriormente; y b) tratamiento médico del mamífero que necesita dicho tratamiento; en el que dicho tratamiento médico se basa en el estadio de la enfermedad que va a tratarse. Por "tratamiento médico" o "medicación" tal como se usa en la presente memoria descriptiva quiere decirse el uso de medicamentos, productos terapéuticos y/o ejercicios con el fin de apoyar y acelerar la regresión de los síntomas de la inflamación. El tratamiento médico se lleva a cabo clásicamente usando fármacos o combinaciones de fármacos que se prescriben específicamente por el médico encargado experto. No obstante, el término medicación no debe limitarse a la ingestión de fármacos, sino que incluye todas las formas posibles de tratamiento que muestren un beneficio para el sujeto que va a tratarse.

15 Debido al hecho de que la medicación se basa en el estadio de la enfermedad que va a tratarse, el médico encargado alterará habitualmente el esquema de tratamiento y/o el grupo de fármacos prescritos y usados con el fin de tratar la enfermedad inflamatoria. Esta alteración, que se basa en los resultados del diagnóstico según el método de la presente invención, permitirá que el tratamiento sea más temprano, más específico y por tanto más eficaz para el paciente. Además, una medicación temprana ahorrará costes, reducirá la necesidad de permanecer en la clínica y permitirá un tratamiento ambulatorio en el hogar, lo que aumentará la comodidad del paciente incluso adicionalmente. Las alteraciones del esquema de tratamiento se basan en el diagnóstico según la presente invención que, en este caso, puede describirse por la "monitorización" de los estadios de la enfermedad y el éxito de una medicación. Además, pueden evitarse efectos secundarios graves que se producen durante el tratamiento con quimioterápicos, por ejemplo MTX, en casos en los que se diagnosticó que el riesgo de una recaída para los pacientes era bajo o no estaba presente en absoluto.

25 En un método preferido de tratamiento tal como se describe, el marcador inflamatorio convencional se selecciona del grupo que consiste en CRP, lipocalina neutrofílica humana, VSG, receptores solubles, por ejemplo Fas, y citocinas. En la mayoría de los casos, tales marcadores convencionales proporcionan una información de "más/menos" o "inflamación-sí/no" sencilla con respecto a una inflamación. Para el fin de la presente invención, estos marcadores proporcionan tanto un control interno como un punto fijo en el tiempo, en el que la inflamación, por ejemplo, está presente y es aguda. La comparación de CALGRANULINA C con el marcador convencional y/o la expresión en la muestra control proporcionará por tanto información viable adicional para el diagnóstico, el tratamiento y especialmente para la prevención de una enfermedad inflamatoria.

35 También se describe un método de prevención de una enfermedad inflamatoria en un mamífero que lo necesita, que comprende las etapas de: a) llevar a cabo las etapas a) a c) según la reivindicación 1; y b) tratamiento médico del mamífero que necesita dicho tratamiento; en el que dicho tratamiento médico se basa en el estadio de la enfermedad que va a prevenirse. En el contexto de la presente invención, el término "prevención" significa un tratamiento específico de una enfermedad que no presenta aún síntomas "clásicos" (como los mencionados anteriormente, por ejemplo inducción de marcadores convencionales), pero puede diagnosticarse mediante el método según la presente invención anteriormente, por ejemplo riesgo de recaída. Basándose en la información del diagnóstico según la presente invención, el médico encargado comenzará habitualmente (por ejemplo "alterará") un esquema de tratamiento y/o el grupo de fármacos prescritos y usados con el fin de prevenir (tratar) la enfermedad inflamatoria. Este tratamiento de "inicio temprano", que se basa en los resultados del diagnóstico según el método de la presente invención, permitirá una prevención más eficaz que con marcadores convencionales, permitiendo por tanto una prevención más eficaz para el paciente. Además, una medicación temprana ahorrará costes, reducirá la necesidad de permanecer en la clínica y permitirá un tratamiento ambulatorio en el hogar, lo que aumentará la comodidad del paciente incluso adicionalmente. Finalmente, la posibilidad de diagnosticar un riesgo de una recaída de una enfermedad usando el método de la invención permite un tratamiento sólo en casos en los que tal tratamiento es necesario, evitando y/o reduciendo por tanto los efectos secundarios para los pacientes que se tratan, por ejemplo, con quimioterápicos, por ejemplo MTX, y/o con un anticuerpo, por ejemplo infliximab.

50 En un método preferido de prevención, el marcador antiinflamatorio convencional se selecciona del grupo que consiste en CRP, lipocalina neutrofílica humana, VSG, receptores solubles, por ejemplo Fas, y citocinas. Tales marcadores convencional proporcionan una información de "más/menos" o "inflamación sí/no" sencilla con respecto a una inflamación. Para el fin de la presente invención, estos marcadores proporcionan tanto un control interno como un punto fijo en el tiempo, en el que la inflamación, por ejemplo, está presente y es aguda. La comparación de CALGRANULINA C con el marcador convencional y/o la expresión en la muestra control proporcionará por tanto información viable adicional para el diagnóstico, el tratamiento y especialmente para la prevención de una enfermedad inflamatoria.

60 En un método preferido de prevención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria localizada. Tales inflamaciones localizadas contrastan con infecciones y/o inflamaciones sistémicas, como, por ejemplo, septicemia o síndrome de choque tóxico bacteriano. En estos casos, la prevención de la inflamación tendrá el beneficio adicional de prevenir una propagación de la infección local y por tanto del desarrollo desde una inflamación local hasta una

sistémica (es decir, no localizada). No obstante, el uso de CALGRANULINA C como marcador no debe limitarse a inflamaciones localizadas, ya que este marcador (aunque en un momento ligeramente posterior) también está presente, por ejemplo, en el suero de los pacientes.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

5 La invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos con respecto a las figuras adjuntas. Todos los ejemplos se proporcionan a modo de ejemplo sólo, sin ninguna limitación pretendida del alcance de la invención.

Los ejemplos descritos en los siguientes párrafos que no se refieren a la invención tal como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 7 sirven simplemente como ilustración adicional.

10 Figura 1: Muestra las concentraciones de CALGRANULINA C en sueros de pacientes con FQ antes y después del tratamiento con antibióticos. La figura 1 muestra, por tanto, que la concentración de CALGRANULINA C en suero de pacientes con FQ disminuye tras el tratamiento con antibióticos.

15 Figura 2: Muestra una comparación de marcadores para inflamación (CALGRANULINA C, recuentos de leucocitos, CRP y VSG) en pacientes con FQ. Subgrupos: 1) pacientes con FQ con exacerbación aguda antes del inicio del tratamiento con antibióticos (n=21) 2) pacientes con FQ al final de la terapia con antibióticos (n=21) 3) pacientes ambulatorios con FQ (n=20); 4) esputos de pacientes con FQ con exacerbación aguda (n=10). Se midió la concentración de CALGRANULINA C en suero (1-3) y esputos (4). Los datos se expresan como medias, las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%. Las líneas grises indican el límite superior del intervalo normal. La figura 2 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es el marcador más sensible de la exacerbación de FQ aguda en comparación con recuentos de leucocitos, CRP y VSG. Sólo las concentraciones de CALGRANULINA C muestran diferencias significativas entre exacerbación aguda antes del inicio del tratamiento con antibióticos y ambas situaciones después del tratamiento con antibióticos y en pacientes ambulatorios.

20

25 Figura 3: Muestra los marcadores séricos CRP y CALGRANULINA C en la monitorización de la enfermedad de Kawasaki. Puntos de tiempo indicados 1) inicialmente antes del inicio de la terapia 2) después de la gammaglobulina intravenosa 3) después de 2 semanas 4) en remisión. Los datos se expresan como medias, las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%. Las líneas grises indican el límite superior del intervalo normal. Los asteriscos indican significación estadística. La figura 3 demuestra por tanto que la CALGRANULINA, en comparación con CRP, es adecuada para indicar la diferencia entre el estado inflamatorio de la enfermedad antes y después del tratamiento con gammaglobulina.

30 Figura 4: Muestra los niveles séricos medios para diferentes grupos de pacientes con enfermedad de Kawasaki. A) Nivel inicial en pacientes con lesiones de arterias coronarias B) nivel inicial en pacientes sin lesiones de arterias coronarias C) nivel máximo en pacientes con lesiones de arterias coronarias D) nivel máximo en pacientes sin lesiones de arterias coronarias. La figura 4 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es superior a CRP en la identificación de casos con alto riesgo de lesiones de arterias coronarias.

35 Figura 5: Muestra las concentraciones séricas de CALGRANULINA C en personas control (controles), pacientes con ARJ (ARJ), pacientes con ARJS (ARJS) y pacientes que padecen infecciones bacterianas, así como la concentración de CALGRANULINA C en el líquido sinovial de pacientes con ARJ (ARJ-SF). La figura 5 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C sérica es un marcador altamente sensible que permite la discriminación entre ARJS y ARJ o infecciones bacterianas.

40 Figura 6: Muestra una comparación de las concentraciones de CALGRANULINA C en suero (A) y líquido sinovial (B) en pacientes con artritis psoriásica (APs), artritis reumatoide (AR) y artritis seronegativa (AS) y en controles, respectivamente. (* p < 0,05). La figura 6 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es un marcador sérico que indica inflamación artrítica.

45 Figura 7: Muestra la expresión de CALGRANULINA C en biopsias sinoviales. Prácticamente no se encontró CALGRANULINA C en tejido sinovial de controles sin artritis (A), mientras que se expresaba CALGRANULINA C de manera extensa en tejido sinovial inflamado de pacientes con artritis reumatoide (B). El patrón de expresión en artritis seronegativa era similar a artritis reumatoide (no mostrado). Macrófagos positivos para CD163 eran el tipo celular más abundante en infiltrados pero mostraban una distribución diferente que células positivas para CALGRANULINA C (C). La microscopía de inmunofluorescencia de estudios de doble marcaje demostró claramente la expresión de CALGRANULINA C por neutrófilos positivos para CD15 infiltrantes. Las células doblemente marcadas aparecían amarillas debido a la suma de colores (D). Las imágenes pequeñas insertadas en la figura 7D muestran la emisión a una única longitud de onda para cualquiera de ambos fluorocromos con anti-CALGRANULINA C-Texas Red (rojo; imagen superior) y a-CD15-FITC (verde; imagen inferior). En artritis psoriásica, se expresaba CALGRANULINA C predominantemente en la capa de subrevestimiento con un patrón perivascular. La expresión de CALGRANULINA C era lo más impresionante alrededor de vasos sanguíneos pequeños y en infiltrados neutrófilos perivasculares (E). Se expresaba CALGRANULINA C por granulocitos adherentes al endotelio vascular y que se infiltran en el tejido intersticial. Parecía liberarse CALGRANULINA C tras el contacto de neutrófilos con el endotelio (F). Se encontró una fuerte expresión de CALGRANULINA C en tejido sinovial de pacientes con artritis psoriásica antes del tratamiento con MTX (G), mientras que era casi indetectable en sinovios de los mismos

50

55

pacientes tras el tratamiento con MTX eficaz (H). Barras de escala, 100 μ m. La figura 7 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es un buen marcador para la inflamación artrítica local usando biopsias sinoviales.

Figura 8: Muestra las concentraciones séricas de CALGRANULINA C en pacientes con artritis psoriásica en enfermedad activa en la presentación inicial y después del tratamiento con MTX. La figura 8 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C sérica es un marcador altamente sensible, que permite monitorizar (mediante medición) el éxito del tratamiento en artritis psoriásica.

Figura 9: Muestra las concentraciones séricas de CALGRANULINA C, CRP y VSG en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Se midió la CALGRANULINA C en 40 pacientes con enfermedad de Crohn, 34 pacientes con colitis ulcerosa y 30 controles sanos. Se midió la CRP en 15 pacientes con enfermedad de Crohn y 26 pacientes con colitis ulcerosa. Se midió la VSG en 28 pacientes con enfermedad de Crohn y 26 pacientes con colitis ulcerosa. Los círculos muestran niveles séricos individuales de pacientes. Los rombos indican valores medios. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95% (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). La figura 9 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es un buen marcador sérico para la inflamación activa en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y, además, que la CALGRANULINA C es un marcador superior para la actividad de enfermedad en colitis ulcerosa.

Figura 10: Datos de VSG y niveles de CALGRANULINA C séricos de seguimiento individuales. Transcursos individuales de CALGRANULINA C, VSG y CAI/CDAI en un paciente con colitis ulcerosa (a) y enfermedad de Crohn (b), respectivamente. Los datos son representativos de 10 pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria. La figura 10 demuestra por tanto una buena correlación de las concentraciones séricas de CALGRANULINA C y la actividad de enfermedad.

Figura 11: Niveles séricos de CALGRANULINA C en pacientes con enfermedad de Crohn debidos al tratamiento con infliximab. Transcursos individuales de CALGRANULINA C y CDAI en 3 pacientes antes, 2 semanas y 4 semanas después del tratamiento con infliximab (a-c). La figura 11 demuestra por tanto una buena correlación de las concentraciones séricas de CALGRANULINA C y la actividad de enfermedad.

Figura 12: Expresión de CALGRANULINA C en tejido de pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn activa. La tinción inmunohistoquímica mostró una expresión extensa de CALGRANULINA C en tejido colónico inflamado de pacientes con enfermedad de Crohn activa (A). Células positivas para CALGRANULINA C rodeaban lesiones granulomatosas en la enfermedad de Crohn (B). Se encontró una expresión local similar de CALGRANULINA C en colitis ulcerosa (C). Numerosas células positivas para CALGRANULINA C se ensamblaban en abscesos crípticos en colitis ulcerosa (D). La tinción de secciones en serie reveló una localización conjunta de células positivas para CALGRANULINA C (E) y células positivas para CD15 (F). En abscesos crípticos destructivos, neutrófilos positivos para CALGRANULINA C transmigraron a través del epitelio hacia la luz (G). La microscopía de inmunofluorescencia de estudios de doble marcaje con anti-CALGRANULINA C-Texas Red (rojo) y α -CD15-FITC (verde) demostró claramente la expresión de CALGRANULINA C por neutrófilos positivos para CD 15 infiltrantes (H). Las células doblemente marcadas aparecían amarillas debido a la suma de colores. Las figuras pequeñas insertadas en (H) muestran la emisión a una única longitud de onda para cualquiera de ambos fluorocromos. Las barras de escala indican 100 μ m. La figura 12 demuestra por tanto que la CALGRANULINA C es un buen marcador para la inflamación local de tejido intestinal.

Figura 13: Muestra las concentraciones séricas de CALGRANULINA C de pacientes con ARJ en remisión sin ningún signo clínico o de laboratorio de actividad inflamatoria residual. Los pacientes del grupo 1 (1 en el eje X), que recayeron en el plazo de 12 meses después de la interrupción del tratamiento con MTX tenían concentraciones de CALGRANULINA C significativamente superiores en el suero que pacientes del grupo 2 (2 en el eje X), que mostraron remisión durante más de 12 meses. La figura 13 muestra por tanto que la CALGRANULINA C es adecuada como marcador para el riesgo de recaída de pacientes con ARJ en remisión.

Figura 14: Muestra las concentraciones de CALGRANULINA C en sobrenadante de neutrófilos tras la estimulación con TNF alfa. Las células o bien se dejaron sin tratar (w/o) o bien se estimularon con TNF alfa durante 15 y 30 minutos, respectivamente. (** $p < 0,01$; $n=3$). La figura 14 muestra por tanto la secreción de CALGRANULINA C a partir de neutrófilos humanos estimulados.

SEQ ID NO:2 representa la secuencia polipeptídica de CALGRANULINA C, y SEQ ID NO:1 representa la secuencia de ácidos nucleicos de CALGRANULINA C que codifica para el polipéptido.

Sorprendentemente, pudo demostrarse que antisueros de conejo purificados por afinidad policlonales dirigidos contra CALGRANULINA C humana son útiles en un método para diagnosticar enfermedades inflamatorias, particularmente para diagnosticar estadios específicos de enfermedades inflamatorias y/o para determinar el riesgo de recaída y/o para discriminar entre enfermedades con síntomas similares con el fin de aplicar una medicación apropiada.

Se encontró sorprendentemente que el polipéptido de CALGRANULINA C según SEQ ID NO:2 y/o ácidos nucleicos que codifican para éste según SEQ ID NO:1 y/o un anticuerpo dirigido contra este polipéptido eran útiles para estas necesidades de diagnóstico específicas.

Los resultados presentados en las figuras adjuntas y comentados en los ejemplos a continuación indican que la CALGRANULINA C es un potente marcador para por ejemplo la exacerbación de FQ aguda. Las concentraciones séricas de CALGRANULINA C están significativamente elevadas en pacientes con FQ con exacerbación en comparación con controles sanos. Además, los niveles séricos se correlacionaban con la actividad de enfermedad en pacientes individuales. En todos los pacientes, las concentraciones de CALGRANULINA C disminuyeron durante la terapia con antibióticos (figura 1). Incluso en los cuatro casos con nivel sérico inicial dentro del intervalo normal, se detectó una disminución, lo que indica posiblemente que los perfiles personales podrían ser más útiles que pruebas séricas individuales. La CALGRANULINA C es un indicador más sensible para la exacerbación aguda que los marcadores convencionales CRP, VSG y recuentos de leucocitos (figura 2). Es el único parámetro con diferencias altamente significativas entre pacientes con exacerbación aguda antes del tratamiento y después del tratamiento, así como entre pacientes con exacerbación aguda y pacientes ambulatorios con FQ, respectivamente.

Además, la CALGRANULINA C es un potente marcador para monitorizar el transcurso de la vasculitis, en particular la enfermedad de Kawasaki (figura 3), y para el pronóstico de pacientes con lesiones de arterias adicionales (figura 4).

La CALGRANULINA C es también un marcador sistémico para la actividad de enfermedad en enfermedades de artritis inflamatoria (figuras 5, 6, 8 y 13) así como en enfermedades intestinales inflamatorias (figuras 9, 10 y 11).

Además, la CALGRANULINA C es un marcador para la detección de inflamación local cuando se usan biopsias y muestras de tejido, respectivamente (figuras 7 y 12).

Finalmente, la CALGRANULINA C es un potente marcador para discriminar una inflamación aguda debida a infección de la enfermedad inflamatoria crónica básica.

Ejemplo 1: Identificación de CALGRANULINA C humana como marcador ventajoso para exacerbaciones agudas en pacientes con fibrosis quística (FQ)

Preparación de CALGRANULINA C

Se aisló CALGRANULINA C de granulocitos humanos tal como se describió en detalle anteriormente (Vogl *et al.*, 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296; van den Bos, 1998, Prot Expr Purif 13: 313-318).

Preparación de antisueros anti-CALGRANULINA C

Se prepararon antisueros de conejo purificados por afinidad dirigidos contra CALGRANULINA C humana (anti-CALGRANULINA C) tal como se notificó anteriormente (Vogl *et al.*, 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296, van den Bos *et al.*, 1998, Protein Expr Purif 13:313-8). Se analizó la monoespecificidad del anticuerpo anti-CALGRANULINA C humana de conejo mediante inmunoreactividad contra CALGRANULINA C humana y recombinante purificada, y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de lisados de granulocitos.

Determinación de las concentraciones de CALGRANULINA C mediante ELISA de tipo "sándwich"

Se determinaron las concentraciones de CALGRANULINA C en el suero de pacientes mediante un sistema de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo "sándwich" doble. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Dinamarca) a 50 µl/pocillo con 10 ng/pocillo de anti-CALGRANULINA C en tampón carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,6; se incubaron durante 16 h a 4°C; se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato y Tween 20 al 0,1%, pH 7,4 (tampón de lavado); y se bloquearon con tampón de lavado que contenía albúmina sérica bovina al 0,25% (tampón de bloqueo) durante 1 h a 37°C. Se lavaron las placas una vez con tampón de lavado y se añadieron 50 µl de muestras con diluciones variables en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se calibró el ELISA con CALGRANULINA C purificada en concentraciones que oscilaban entre 0,016 y 125 ng/ml. El ensayo tiene un intervalo lineal entre 0,5 y 10 ng/ml y una sensibilidad de <0,5 ng/ml. Tras 3 lavados, se añadieron 20 ng/pocillo de anticuerpo anti-CALGRANULINA C humana de conejo biotinilado y se incubó durante 30 min. a 37°C. Se lavaron las placas tres veces y se incubaron con conjugado de estreptavidina-peroxidasa del rábano (dilución 1:5000; Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.) durante 30 min. a 37°C. Tras lavar tres veces, se incubaron las placas con ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenziazolinsulfónico); Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y H₂O₂ (10 mg de ABTS y 10 µl de H₂O₂ (30%) en 25 ml de tampón citrato 0,05 M, pH 4,0) durante 20 min. a temperatura ambiente. Se midió la absorbencia a 405 nm con un lector de ELISA (lector de microplacas MRX, Dynatech Laboratories, St Peter Port, Guernsey, RU).

Pacientes y controles sanos

Se determinaron las concentraciones séricas de CALGRANULINA C de 17 pacientes internos con FQ (9 chicos, 8 chicas; la edad media en el momento de entrada en el estudio era de 21,1 años, intervalo de 10-35 años), que recibían terapia con antibióticos intravenosos tras 21 ciclos de exacerbación aguda al comienzo y al final del tratamiento con antibióticos. La duración media de la hospitalización para la terapia real era de 2 semanas. Los

motivos principales para la hospitalización eran el deterioro global del bienestar, la producción excesiva de esputos viscosos y el aumento de la tos productiva.

Se investigaron 18 pacientes ambulatorios con FQ (10 chicos, 8 chicas; edad media de 21,8 años con intervalo de 8-31 años) sin exacerbación aguda, que se sometieron a toma de muestra de sangre en 20 ocasiones por otros motivos, para el mismo parámetro inflamatorio y para la detección de CALGRANULINA C. Se analizaron muestras de esputos de 5 pacientes con FQ con exacerbación aguda.

Se estimaron los niveles séricos de CALGRANULINA C en 18 adultos sanos (edad media de 31,9; intervalo de 19-43) y 16 niños sin signos de inflamación (edad media de 10,9; intervalo de 3-17). En conjunto, se investigaron 34 controles normales (edad media de 22,0; intervalo de 3-43).

10 *Análisis estadístico*

Se realizó una prueba de la T de Student para determinar diferencias de expresión de CALGRANULINA C entre distintas categorías. Los datos se expresan como media \pm DE. Se consideró que valores de p mayores de 0,05 no eran significativos.

Resultados del análisis de CALGRANULINA C

15 Las medias de CALGRANULINA C normales eran de 64 ± 36 ng/ml para controles de adultos sanos y 50 ± 32 ng/ml para niños sanos. La media global en controles sanos era de 57 ng/ml. No hubo diferencias significativas para la distribución por edad y género.

20 Los pacientes con FQ con exacerbación aguda tenían niveles séricos de CALGRANULINA C significativamente elevados (media de 381 ng/ml, intervalo de 40-1429 ng/ml; $p < 0,01$). En 17 de 21 casos (81%), los niveles séricos de CALGRANULINA C estaban por encima de la media normal más dos desviaciones estándar. Tras 2 semanas de terapia con antibióticos intravenosos, el nivel de CALGRANULINA C medio en estos pacientes disminuyó hasta 130 ng/ml (intervalo de 17-524 ng/ml). El nivel de CALGRANULINA C medio para pacientes ambulatorios con FQ sin exacerbación era de 126 ng/ml (intervalo de 35-320 ng/ml). Hubo una diferencia significativa entre los valores de CALGRANULINA C de pacientes con exacerbación aguda antes del tratamiento y después del tratamiento. El nivel de CALGRANULINA C medio en esputos de pacientes con FQ pacientes con exacerbación aguda era de 5.600 ± 4.350 ng/ml.

25 El transcurso de tiempo individual de los niveles de CALGRANULINA C en 21 casos de exacerbación aguda se muestra en la figura 1. No todos los pacientes alcanzaron valores dentro del intervalo normal, especialmente cuando presentaban niveles extremadamente altos al inicio de la terapia con antibióticos.

30 *Parámetros inflamatorios para comparación*

35 Se encontró CRP elevada en 13 de 21 casos de exacerbación aguda antes del inicio de la terapia con antibióticos (61%). Hubo una diferencia significativa entre las concentraciones medias de CRP en pacientes con exacerbación aguda antes ($1,87 \pm 2,94$ mg/dl; intervalo de 0-10,6) y después de la terapia con antibióticos ($0,15 \pm 0,39$ mg/dl; intervalo de 0-1,6). No obstante, las diferencias medias entre exacerbación aguda y pacientes ambulatorios sin infección aguda ($0,52 \pm 0,40$ mg/dl; intervalo de 0-1,5) no eran significativas. La VSG estaba por encima del intervalo normal en 14 de 21 casos (66%). Se encontró una diferencia significativa para VSG entre pacientes con exacerbación aguda (25 ± 18 mm/h; intervalo de 4-51) y pacientes ambulatorios (12 ± 9 mm/h; intervalo de 1-28). La VSG de pacientes con exacerbación aguda antes y después de la terapia con antibióticos (17 ± 15 mm/h; intervalo de 6-36) no difería significativamente. En 12 casos (56%), los recuentos de leucocitos estaban por encima de $10.000/\mu\text{l}$. Los recuentos de leucocitos eran significativamente superiores en exacerbación aguda antes ($11.260 \pm 3.948/\mu\text{l}$; intervalo de 2.900-22.100) que después del tratamiento con antibióticos ($7.920 \pm 2.311/\mu\text{l}$; intervalo de 2.500-12.500), pero no se encontró tal diferencia entre pacientes con exacerbación aguda antes del tratamiento y pacientes ambulatorios ($9,583 \pm 3,438/\mu\text{l}$; intervalo de 4.300 - 16.500). Los datos se resumen en la figura 2.

45 La CALGRANULINA C es por tanto potente y fiable como marcador para la exacerbación aguda de FQ. Es un marcador temprano de inflamación y se correlaciona con la actividad de enfermedad. Es superior a indicadores convencionales de inflamación en la diferenciación de las fases aguda y crónica de la enfermedad. En particular, la determinación de los niveles séricos de perfiles individuales de CALGRANULINA C es útil para determinar estados de exacerbación aguda.

50 Ejemplo 2: Identificación de CALGRANULINA C como marcador útil en la monitorización de la enfermedad de Kawasaki

Pacientes y controles sanos

Se analizó CALGRANULINA C mediante el uso del método de ELISA descrito anteriormente así como los niveles de CRP de 6 pacientes femeninos y 15 masculinos (edad media de 2,5 años; intervalo de 0,4-7,2) que cumplen los criterios de la enfermedad de Kawasaki, que se trataron con gammaglobulina intravenosa (2 g/kg de peso corporal).

Se determinaron las concentraciones de CALGRANULINA C en el suero de pacientes con la enfermedad de Kawasaki mediante un sistema de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo "sándwich" doble descrito en el ejemplo 1. Además, se realizaron la preparación de proteínas y anticuerpos tal como se describió anteriormente. Se tomaron muestras de suero al inicio de la terapia, directamente después del tratamiento con gammaglobulina, 2 semanas tras el inicio de la terapia, y en remisión. La duración media de la fiebre fue de 7,5 días (intervalo de 5-13). El máximo medio de recuento de glóbulos blancos fue de 14.900/ μ l (intervalo 5.300-24.400), con un promedio del 63% de neutrófilos. 8 pacientes tenían lesiones de arterias coronarias (CAL) y se les diagnosticó aneurismas coronarios. Todos los pacientes con CAL eran masculinos. No hubo diferencia significativa en la distribución por edad entre pacientes con y sin CAL (edad media de 2,4 frente a 2,6 años). Los pacientes con CAL tenían una duración de la fiebre más larga y niveles superiores de CALGRANULINA C, CRP, glóbulos blancos y recuentos de neutrófilos.

Resultados del análisis de CALGRANULINA C

El nivel de CALGRANULINA C inicial medio antes de la terapia era de 450 ± 348 ng/ml (intervalo de 31-1.330 ng/ml). El nivel de CALGRANULINA C medio disminuyó significativamente después del tratamiento con gammaglobulina (236 ± 244 ng/ml; intervalo de 9-1071; $p < 0,05$). Los niveles de CALGRANULINA C tras 2 semanas eran de 84 ± 88 ng/ml (intervalo de 15-402). Los niveles de CALGRANULINA C detectados en remisión completa eran de 83 ± 84 ng/ml (intervalo de 6-371). El nivel de CRP inicial medio era de $8,9 \pm 3,5$ mg/dl (intervalo de 2,5 - 16,0 mg/dl). Los niveles de CRP medios disminuyeron hasta $6,3 \pm 6,9$ mg/dl (intervalo de 0,8-28,7 mg/dl) después del tratamiento con gammaglobulina, sin mostrar una diferencia significativa con respecto a los niveles iniciales. Los niveles de CRP medios eran de $1,5 \pm 2,1$ mg/dl (intervalo de 0-8,9 mg/dl) tras 2 semanas, y de 0,15 mg/dl (intervalo de 0-0,6 mg/dl) en remisión. La figura 3 muestra los niveles de CALGRANULINA C y CRP detectados en el transcurso de la enfermedad de Kawasaki.

La CALGRANULINA C media en 16 controles sanos (edad media de 10,9; intervalo de 3-17) era de 50 ± 32 ng/ml. Se identificaron niveles superiores a dos desviaciones estándar por encima de la media como anómalos, conduciendo a un valor de punto de corte de 115 ng/ml. Dos pacientes tenían niveles de CALGRANULINA C dentro del intervalo normal a lo largo del transcurso completo de la enfermedad. Estos pacientes tenían enfermedad leve sin aneurismas coronarios y fiebre durante sólo 5 y 6 días, respectivamente.

Pacientes con aneurismas de arterias coronarias tenían niveles de CALGRANULINA C y CRP iniciales y máximos superiores que pacientes sin complicaciones cardíacas, y por tanto la diferencia para las concentraciones de CALGRANULINA C era mayor que para CRP (figura 4).

El presente estudio indica que la proteína CALGRANULINA C de unión a calcio es un potente marcador para la enfermedad de Kawasaki con una sensibilidad del 91%. Los niveles séricos se correlacionaban con la actividad de enfermedad en pacientes individuales. La CALGRANULINA C puede determinar la respuesta a la terapia de manera temprana después del tratamiento con gammaglobulina. Es el único parámetro con diferencias altamente significativas entre pacientes con enfermedad de Kawasaki antes del tratamiento con gammaglobulina y después del tratamiento. Además, es superior a CRP en la identificación de casos con alto riesgo de lesiones de arterias coronarias. Por tanto, la CALGRANULINA C es un indicador temprano de inflamación aguda en la cascada de vasculitis y posiblemente otros trastornos autoinmunitarios.

Ejemplo 3: Identificación de CALGRANULINA C como marcador útil en la identificación temprana de artritis juvenil de comienzo sistémico (ARJS), especialmente mediante discriminación de infección bacteriana

Usando el ELISA de CALGRANULINA C descrito anteriormente en detalle, se analizaron las concentraciones séricas de proteínas CALGRANULINA C en pacientes con ARJS, en pacientes con la forma de oligoartritis activa de artritis reumatoide juvenil (ARJ), en pacientes con infecciones bacterianas (valor de CRP > 50 mg/l; valor de CRP promedio: 95 mg/l) y en personas control ($n=20$). Además, se midieron las concentraciones de CALGRANULINA C en el líquido sinovial de pacientes con ARJ con el fin de demostrar la idoneidad de la CALGRANULINA C como marcador de inflamación local.

Sorprendentemente, se encontró que los niveles séricos de CALGRANULINA C estaban drásticamente elevados en pacientes con ARJS, mientras que estaban sólo moderadamente elevados tanto en pacientes con ARJ como en pacientes con infecciones bacterianas (figura 5): las concentraciones de CALGRANULINA C eran de manera significativa aproximadamente 10 veces superiores en pacientes con ARJS en comparación con pacientes con ARJ y con pacientes con infecciones bacterianas. Por tanto, la CALGRANULINA C es el primer marcador para discriminar de manera fiable entre ARJS e infecciones bacterianas.

Además, se encontró que la razón de concentración de CALGRANULINA C y concentración de CRP es una medida excelente y fiable para diagnosticar ARJS con alta especificidad y sensibilidad ($> 80\%$).

Ejemplo 4: Identificación de CALGRANULINA C como marcador para el riesgo de recaída de pacientes con artritis reumatoide juvenil (ARJ) tras el primer tratamiento satisfactorio

Se determinaron las concentraciones de CALGRANULINA C en el suero de pacientes en remisiones clínicas en el criterio de valoración de la terapia con metotrexato (MTX). Además, se determinaron CRP y VSG. Se compararon los valores de dos grupos: Grupo 1: recaída de la enfermedad en el plazo de un año. Grupo 2: sin recaída en el plazo de 1 año, es decir, remisión a largo plazo. Sorprendentemente, se encontró que sólo las concentraciones séricas de CALGRANULINA C eran significativamente diferentes entre los dos grupos y por tanto son adecuadas para el pronóstico y por tanto para un tratamiento adecuado. Se encontró que la VSG no era adecuada en absoluto. La CRP es negativa en todos los pacientes (n=8) investigados, con la excepción de dos; por tanto, la sensibilidad es altamente inadecuada.

Por tanto, pudo identificarse la CALGRANULINA C como el primer marcador para la determinación de la actividad de enfermedad en pacientes con ARJ, especialmente para diagnosticar el riesgo de recaída.

Ejemplo 5: Identificación de CALGRANULINA C como marcador para artritis psoriásica reumatoide*Pacientes y controles sanos*

Se investigaron 42 pacientes con artritis inflamatoria crónica. Se analizaron las concentraciones de CALGRANULINA C en suero y líquido sinovial usando un ELISA de tipo "sándwich" tal como se describió anteriormente. Se determinaron los niveles séricos de 14 pacientes (9 masculinos, 5 femeninos; edad media de 40 años; intervalo de 21-64) que padecen artritis psoriásica (duración media de la enfermedad de 14,6 ± 8,6 meses), que se trataron con el fármaco antiinflamatorio MTX (dosis media de 12,9 ± 4,8 mg). No tomaron ninguna otra medicación aparte de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Se obtuvo suero antes y después del tratamiento (intervalo de seguimiento medio de 6,4 ± 1,3 meses). Además, estaban disponibles muestras de líquido sinovial y suero apareadas de 28 pacientes que se sometieron a artroscopia (8 pacientes con artritis psoriásica, 9 pacientes con artritis reumatoide, 11 pacientes con artritis seronegativa). Todos los pacientes los examinó el mismo médico. Se documentó el estado clínico de los pacientes registrando la rigidez matutina, la puntuación de dolor, el índice articular de Ritchie (RI) (Ritchie *et al.*, 1968, QJ Med 37: 393-406) y el número de articulaciones hinchadas ("swollen joint count", SJC). Los pacientes con artritis reumatoide tenían articulaciones significativamente más afectadas según SJC y RI que aquéllos con artritis seronegativa. Los pacientes con artritis seronegativa estaban entre estos grupos. Además del estado clínico, se documentaron CRP, VSG, anticuerpos anti-nucleares (ANA) y factor reumatoide (RF).

Se determinaron los valores normales de CALGRANULINA C en el suero de 15 adultos sanos sin signos de inflamación, que o bien se sometieron a pruebas sanguíneas rutinarias en el Hospital Universitario de Muenster o bien se presentaron como voluntarios en los laboratorios. Los pacientes y los controles no diferían en la distribución por edad o género. Los datos de pacientes y controles sanos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Características de pacientes con artritis psoriásica (APs), artritis reumatoide (AR) y artritis seronegativa (AS), y controles sanos, respectivamente.

	APs	APs (grupo de MTX)	AR	AS	Controles
Pacientes (n.º)	8	14	9	11	15
Varones/mujeres	5/3	9/5	5/4	6/5	10/5
Edad (años)					
Media	43	40	53	33	32
Intervalo	28-67	21-64	28-72	18-45	19-43
Actividad (puntos)					
RI	6,3 ± 2,4	6,3 ± 1,5	15,7 ± 3,2 *	2,2 ± 0,6	n.d.
SJC	9,8 ± 3,7	9,6 ± 2,0	17,2 ± 3,2*	1,9 ± 0,6	n.d.
Medicación					
AINE (n.º)	4	14	6	7	0
Esteroides (n.º)	0	0	1	0	0
Laboratorio					

CRP (mg/dl)	5,2 ± 2,3 *	3,6 ± 1,2	5,4 ± 1,8 *	2,3 ± 0,7	n.d.
VSG (mm/h)	37 ± 12*	28 ± 9	49 ± 8 *	25 ± 5	4 ± 1
ANA ⁺ (n.º)	0	2	5	4	n.d.

RI = índice articular de Ritchie; SJC = recuento de articulaciones hinchadas; SF = líquido sinovial; n.d. = no determinado; datos expresados como media ± EEM excepto que se establezca otra cosa; * p < 0,05

Análisis estadístico

Se realizaron la prueba de la U de Mann-Whitney (para valores independientes sin distribución normal) y la prueba de Wilcoxon (para variables dependientes) para determinar diferencias significativas entre distintas categorías. Se usó SPSS para Windows versión 9.0 para determinar la correlación de CALGRANULINA C con otros parámetros. Los datos se expresan como media ± EEM. Se consideró que valores de p mayores de 0,05 no eran significativos.

Resultados del análisis de CALGRANULINA C en suero y líquido sinovial

Los niveles de CALGRANULINA C eran los más altos en artritis reumatoide (media de 340 ± 90 ng/ml), y estaban notablemente elevados en artritis psoriásica (media de 260 ± 60 ng/ml), y estaban menos pero todavía significativamente elevados en artritis seronegativa (190 ± 20 ng/ml) en comparación con controles sanos (60 ± 20 ng/ml). En muestras de suero y líquido sinovial apareadas, se encontraron niveles de CALGRANULINA C de 4 a 10 veces superiores en líquido sinovial que en suero en todos los pacientes. Los niveles de CALGRANULINA C en líquido sinovial eran superiores en artritis seronegativa (4.920 ± 1.680 ng/ml) que en artritis reumatoide y artritis psoriásica (1.870 ± 1.160 ng/ml y 1.720 ± 425 ng/ml, respectivamente). Las concentraciones séricas de CALGRANULINA C se correlacionaban bien con otros parámetros usados para determinar la actividad de enfermedad, lo más significativamente con VSG (r = 0,47; p < 0,01) y RI (r = 0,36; p < 0,01). Los datos se resumen en la figura 6.

En el presente documento se demuestra que los niveles séricos de CALGRANULINA C son un marcador útil para la actividad de enfermedad local en diferentes formas de artritis.

Expresión local de CALGRANULINA C en tejido sinovial

Para confirmar la expresión local de CALGRANULINA C en sitios de inflamación, se realizaron estudios inmunohistoquímicos. Se realizaron biopsias sinoviales en 4 pacientes con artritis psoriásica antes y después de la terapia con MTX. Además, se obtuvieron biopsias de 5 pacientes con artritis psoriásica que no recibieron MTX, 2 pacientes con artritis reumatoide y 2 pacientes con artritis seronegativa. Dos biopsias de pacientes sin inflamación sinovial sirvieron como controles negativos. Se prepararon secciones criofijadas e incrustadas en parafina tal como se conoce comúnmente en la técnica. Se usó anticuerpo anti-CALGRANULINA C humana de conejo para detectar la expresión de CALGRANULINA C. Se usó anticuerpo anti-CD15 humano de ratón, un antígeno asociado a granulocitos, para detectar granulocitos en infiltrados. Se empleó anticuerpo anti-CD163 humano de ratón (clon RM3/1, que detecta un receptor de eliminación específico de macrófagos) para caracterizar macrófagos en infiltrados. Se usaron como controles negativos anticuerpos control de especies coincidentes de especificidad irrelevante. Finalmente, se contratiñeron las secciones con hematoxilina de Mayer. Se usaron anticuerpos secundarios y sustratos para las reacciones de coloración tal como se describe a continuación. Para experimentos de doble marcaje, al anticuerpo anti-CALGRANULINA C le siguió el anticuerpo anti-CD15. Se usaron anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra purificados por afinidad conjugados con o bien Texas Red o bien FITC (Dianova, Hamburgo, Alemania). Se analizó la fluorescencia usando un dispositivo Zeiss Axioskop conectado a una cámara Axiocam provista de Axiovision 3.0 para Windows (Zeiss, Göttingen, Alemania). No se detectó reactividad cruzada o rebosamiento en experimentos control tras omitir anticuerpos específicos o reemplazarlos por anticuerpos control de isotipo coincidente de especificidad irrelevante.

Los resultados se muestran en la figura 7. No se encontró CALGRANULINA C en tejido sinovial de controles sin artritis. Se encontró expresión de CALGRANULINA C en tejido sinovial inflamado de pacientes con artritis reumatoide, artritis seronegativa y artritis psoriásica. En artritis reumatoide y artritis seronegativa, se encontraron células positivas para CALGRANULINA C en infiltrados y la capa de revestimiento. Había una tinción difusa para CALGRANULINA C en asociación con infiltrados, lo que indica CALGRANULINA C extracelular tras la secreción por granulocitos infiltrantes. Hubo un patrón de expresión distinto de CALGRANULINA C en artritis psoriásica en comparación con artritis reumatoide y artritis seronegativa con una fuerte asociación de la expresión de CALGRANULINA C con vasos sanguíneos pequeños. Se expresaba CALGRANULINA C por granulocitos que se adherían al endotelio de vasos sinoviales y en infiltrados perivasculares. Parecía liberarse CALGRANULINA C por células en el endotelio de sinovios inflamados de artritis psoriásica también. La tinción conjunta con CD15 reveló que principalmente los granulocitos expresaban CALGRANULINA C. Se demostró la expresión conjunta de CALGRANULINA C y CD 15 en experimentos de doble marcaje usando microscopía de inmunofluorescencia. La tinción para CD 163 reveló claramente un patrón diferente para macrófagos, lo que contribuía a la mayoría de las células en tejido sinovial inflamado.

En este primer análisis de tejido sinovial humano de diferentes formas de artritis, se encontró una clara diferencia en la distribución de CALGRANULINA C en artritis psoriásica en comparación con artritis reumatoide y artritis seronegativa. Se encontró una distribución distinta de CALGRANULINA C con pronunciación perivascular. El patrón de expresión perivascular en APs apunta a un posible papel de la CALGRANULINA C en la angiogénesis asociada con esta forma de artritis.

Correlación de la CALGRANULINA C con la actividad de enfermedad en respuesta al tratamiento

Se analizó el efecto del tratamiento con MTX sobre la expresión de CALGRANULINA C en suero de 14 pacientes con artritis psoriásica y en membranas sinoviales de 4 pacientes. Antes del tratamiento, se encontró una expresión extensa de CALGRANULINA C en tejido sinovial de pacientes con artritis psoriásica antes del tratamiento con MTX (véase la figura 7G), tal como se describió anteriormente de manera predominante en la capa de subrevestimiento y perivascular. La expresión de CALGRANULINA C era casi indetectable en biopsias sinoviales de los mismos pacientes después del tratamiento con MTX eficaz (véase la figura 7H). Las evaluaciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Análisis inmunohistoquímico de CALGRANULINA C expresada en tejido sinovial

	Antes del tratamiento con MTX	Después del tratamiento con MTX
Paciente 1	23	3
Paciente 2	12	<1
Paciente 3	17	<1
Paciente 4	21	<1

Se obtuvo membrana sinovial de 4 pacientes antes y después del inicio del tratamiento con MTX. Se evaluaron todas las secciones para determinar el número de células positivas para CALGRANULINA C por campo seleccionado al azar a 400 aumentos. Se analizaron al menos 10 campos por sección. Se calculó la puntuación media de 10 campos.

Todos los pacientes mejoraron significativamente en las puntuaciones clínicas según RI, puntuación de dolor, SJC y rigidez matutina. Los niveles de CRP y VSG también disminuyeron. La respuesta a la terapia era paralela a una disminución notable de los niveles séricos de CALGRANULINA C después del tratamiento con MTX (media de 240 ng/ml antes frente a 100 ng/ml después de MTX; véase la figura 8). Los niveles de CALGRANULINA C se correlacionaban bien con la mejora de EMS, puntuación de dolor, RI y SJC. Los datos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Mejora de la actividad de enfermedad en pacientes con artritis psoriásica tras el inicio del tratamiento con MTX

	Antes de MTX	Después de MTX
EMS (min.)	76	25 **
Dolor (puntos)	5,3	3,2 *
RI (puntos)	6,3	1,9 **
SJC (n.º)	9,6	3,3 **
VSG (mm/h)	28	12 *
CRP (mg/dl)	4,2	2,5 *

* p < 0,05; ** p < 0,01

Este estudio indica por primera vez un papel de CALGRANULINA C humana en la patogenia de la inflamación sinovial en artritis reumatoide, artritis seronegativa y particularmente artritis psoriásica. Los análisis de CALGRANULINA C en líquido sinovial y suero indican que esta proteína se expresa y se secreta en sitios locales de inflamación en sinovitis. Sólo se han publicado datos sobre CALGRANULINA C en inflamación para el sistema murino aún (Hofmann *et al.*, 1999, Cell 97: 889-901; Schmidt *et al.*, 2001, J Clin Invest 108: 949-955).

Este estudio es también el primero en demostrar la regulación por incremento de la expresión de CALGRANULINA C local en tejido sinovial que da como resultado concentraciones en suero y líquido sinovial elevadas de pacientes con artritis activa crónica. Los análisis de tejido sinovial de pacientes con artritis psoriásica antes y después del inicio de la terapia con MTX revelaron una fuerte correlación de la expresión de CALGRANULINA C con la mejora de la actividad de enfermedad que se vio reflejada en una disminución de las concentraciones séricas de CALGRANULINA C.

Se demuestra además que los niveles séricos de CALGRANULINA C son un marcador útil para la actividad de enfermedad local en diferentes formas de artritis. Pacientes con artritis activa revelaron niveles de CALGRANULINA C significativamente superiores que controles sanos. Se encontraron concentraciones aproximadamente 10 veces

superiores de CALGRANULINA C en líquido sinovial de pacientes. La alta expresión local de CALGRANULINA C en el sitio de inflamación parece ser responsable de los niveles correlacionados que se detectan en el suero. En este contexto, los niveles superiores en líquido sinovial de pacientes con artritis seronegativa en comparación con los niveles séricos se correlacionaban con los menores números de articulaciones afectadas. En artritis psoriásica y especialmente artritis reumatoide, el mayor número de articulaciones inflamadas con secreción de CALGRANULINA C es probable que dé como resultado las concentraciones superiores de CALGRANULINA C encontradas en el suero. En artritis psoriásica, los niveles de CALGRANULINA C reflejaban el tratamiento inmunosupresor satisfactorio con MTX. La CALGRANULINA C era un marcador fiable de los efectos de la terapia con MTX en suero y sinovio. El profundo efecto de MTX sobre la expresión de CALGRANULINA C en los sinovios de pacientes con artritis psoriásica podría deberse a la reducción de citocinas proinflamatorias que activan neutrófilos e inducen la expresión de CALGRANULINA C (Dolhain *et al.*, 1998, Br J Rheumatol 37: 502-508). Por otro lado, hay un efecto directo de MTX sobre la quimiotaxis de neutrófilos que podría inhibir la migración de neutrófilos al tejido sinovial (Kraan *et al.*, 2000, Arthritis Rheum 43: 1488-1495).

La expresión de CALGRANULINA C en artritis humana suscita la cuestión de si esta proteína y su interacción con RAGE podría ser una diana para terapias novedosas. En diferentes modelos de ratón de inflamación incluyendo artritis, el bloqueo de esta interacción con RAGE soluble (sRAGE) y anticuerpos anti-CALGRANULINA C reveló claros efectos antiinflamatorios (Hofmann *et al.*, 1999, Cell 97: 889-891; Schmidt *et al.*, 2001, J Clin Invest 108: 949-955). Las pruebas de un papel funcional de CALGRANULINA C en artritis humana junto con los efectos beneficiosos de agentes bloqueantes en modelos de ratón de inflamación hacen que esta proteína sea atractiva para el desarrollo de nuevas terapias biológicas que se centran en las actividades proinflamatorias de la CALGRANULINA C humana.

Por tanto, este ejemplo demuestra que CALGRANULINA C sérica es adecuada como marcador altamente sensible que permite monitorizar (mediante medición) el éxito del tratamiento en artritis reumatoide.

Ejemplo 6: Uso de CALGRANULINA C como marcador para determinar el estadio de enfermedad en la enfermedad intestinal inflamatoria

25 *Pacientes y controles sanos*

Se investigaron pacientes con enfermedad de Crohn (n=40), pacientes con colitis ulcerosa (n=34) y controles sanos (n=30): se midieron los niveles séricos de proteína CALGRANULINA C tal como se describió anteriormente usando ELISA. En paralelo, se determinaron CRP y VSG. Se documentó la actividad de enfermedad en la enfermedad de Crohn usando el índice de actividad de enfermedad de Crohn (CDAI; Best *et al.*, 1976, Gastroenterology 70: 439-444), y para la colitis ulcerosa usando el índice de actividad de colitis (CAI; Rachmilewitz, 1989, Br Med J 298: 82-86) y usando los criterios de Truelove y Witts (1955, Br Med J 2: 1041-1048). Los datos de pacientes se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Características de pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias

	Enfermedad de Crohn	Colitis ulcerosa
Número de pacientes	40	34
Mujeres/varones	28/12	10/24
Edad (años)		
Media	32	33
Intervalo	18-56	19-60
Actividad de enfermedad *		
Activa	30	15
Inactiva	10	19
Medicación		
Esteroides	23	21
5-ASA o sulfasalazina	36	33
Azatioprina	8	8
Infliximab	3	0
Sin tratamiento	0	1

* Evaluación de la actividad de enfermedad usando CDAI en EC y CAI en CU, respectivamente. La enfermedad activa se define como CDAI > 150 o CAI = 4.

35

Además, 10 de los pacientes (6 con enfermedad de Crohn y 4 con colitis ulcerosa) se siguieron a lo largo de un periodo de 8 meses (intervalo de 3-12) para determinar la correlación de los niveles séricos de CALGRANULINA C con transcurros individuales de la actividad de enfermedad.

5 Los controles sanos no presentaban signos de inflamación (14 hombres, 16 mujeres; edad media de 34 años; intervalo de 19-57), que o bien se sometieron a pruebas sanguíneas rutinarias en el Hospital Universitario de Münster o bien se presentaron como voluntarios en el laboratorio. No hubo diferencias significativas para la distribución por edad o género entre controles y pacientes.

Análisis estadístico

10 Se realizó la prueba de la U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas de la expresión de CALGRANULINA C y CRP entre distintas categorías. Se analizó la correlación de marcadores séricos con la actividad de enfermedad con la prueba de Pearson usando el software SPSS versión 9.0 para Windows. Los datos se expresan como valor medio \pm intervalo de confianza del 95%. Se consideró que valores de p mayores de 0,05 no eran significativos.

Resultados del análisis sérico de CALGRANULINA C

15 Los pacientes con enfermedad de Crohn (CDAI > 150, n=30) tenían niveles significativamente elevados en comparación con controles sanos (470 ± 125 ng/ml frente a 75 ± 15 ng/ml; $p > 0,001$). Había también una diferencia significativa entre los niveles séricos de CALGRANULINA C en pacientes con enfermedad de Crohn activa en comparación con enfermedad inactiva (470 ± 125 ng/ml frente a 215 ± 95 ng/ml; $p > 0,01$). Incluso pacientes con enfermedad inactiva revelaron niveles séricos que diferían significativamente de los controles sanos (215 ± 95 ng/ml frente a 75 ± 15 ng/ml; $p > 0,05$). Por tanto, pudo monitorizarse de manera precisa la actividad de enfermedad. Además, pudo demostrarse que los niveles de CALGRANULINA C se correlacionan fuertemente con CDAI, sosteniendo una idoneidad superior para diagnosticar el estadio de enfermedad.

25 En pacientes con colitis ulcerosa activa crónica (CAI ≥ 4 ; n=15), los niveles de CALGRANULINA C estaban también significativamente elevados () en comparación con controles sanos (400 ± 120 ng/ml frente a 75 ± 15 ng/ml; $p < 0,001$). La diferencia entre niveles séricos en colitis ulcerosa activa e inactiva (400 ± 120 ng/ml frente a 115 ± 55 ng/ml; $p < 0,001$) era más pronunciada que en la enfermedad de Crohn. En contraposición a la enfermedad de Crohn, los pacientes con colitis ulcerosa inactiva tenían niveles séricos comparables a los de controles sanos. Además, pudo demostrarse que los niveles de CALGRANULINA C se correlacionaban fuertemente con la actividad de enfermedad tal como se determinó mediante el índice de Truelove y Witt, sosteniendo una idoneidad superior para diagnosticar el estadio de enfermedad. Por tanto, la CALGRANULINA C es un potente marcador sérico para el estadio de enfermedad de la enfermedad inflamatoria del intestino, especialmente para enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

35 Los niveles de CRP eran superiores en pacientes con enfermedad de Crohn activa en comparación con enfermedad inactiva ($2,0 \pm 1,0$ ng/ml frente a $0,3 \pm 0,3$ ng/ml; $p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre los niveles de CRP de pacientes con colitis ulcerosa activa en comparación con pacientes con enfermedad inactiva ($1,1 \pm 0,9$ mg/dl frente a $0,4 \pm 0,3$ mg/dl). La VSG era significativamente superior en pacientes con enfermedad de Crohn activa (22 ± 7 mm/h frente a 9 ± 4 mm/h; $p < 0,01$). Sin embargo, la VSG no difería significativamente entre grupos de pacientes con colitis ulcerosa (10 ± 5 mm/h frente a 12 ± 5 mm/h). Los datos se resumen en la figura 9.

40 Pudo demostrarse además que los niveles séricos de CALGRANULINA C se correlacionaban fuertemente con la actividad de enfermedad en enfermedad de Crohn ($r=0,52$, n=40, $p < 0,01$) así como colitis ulcerosa ($r=0,70$, n=34, $p < 0,001$) (véase la tabla 5 a continuación). Los niveles de CRP eran también superiores en pacientes con enfermedad de Crohn activa en comparación con pacientes con enfermedad inactiva, pero a un nivel de significación inferior ($2,0$ mg/dl frente a $0,3$ mg/dl; $p < 0,05$). De manera interesante, sólo en la enfermedad de Crohn hubo una correlación con CRP y VSG, mientras que no pudo encontrarse correlación para estos marcadores con la actividad de enfermedad en colitis ulcerosa. La precisión cuestionable de estos marcadores clásicos en la enfermedad intestinal inflamatoria está de acuerdo con informes previos (Nielsen *et al.*, 2000, Am J Gastroenterol 95: 359-367; Niederau *et al.*, 1997, Hepatogastroenterology 44: 90-107).

Tabla 5: Correlación de CALGRANULINA C sérica, CRP y VSG con la actividad de enfermedad en enfermedad intestinal inflamatoria

	CALGRANULINA C	CRP	VSG
CDAI en EC	r = 0,52 (n=40)	r = 0,44 (n=25)	r = 0,32 (n=28)
p	<0,01	<0,01	<0,05
CAI en CU	r = 0,70 (n=34)	r = 0,35 (n=26)	r = -0,1 (n=25)
p	< 0,001	n.s.	n.s.

n.s. = no significativo n.s. = no significativo

5 Los datos de seguimiento individual de los niveles séricos de CALGRANULINA C en 10 pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (6 con enfermedad de Crohn y 4 con colitis ulcerosa) a lo largo de un periodo de 8 meses (intervalo de 3-12) mostraron una fuerte correlación con la actividad de enfermedad. En pacientes con colitis ulcerosa, los datos de seguimiento individual mostraban que los niveles de CALGRANULINA C se correlacionaban mejor con la actividad de enfermedad que marcadores establecidos de inflamación tales como VSG (figura 10). Los niveles séricos de CALGRANULINA C disminuyeron rápidamente después del tratamiento con infliximab (figura 11).

Inmunohistoquímica/microscopía de inmunofluorescencia

10 Se usaron secciones congeladas e incrustadas en parafina de biopsias de intestino de pacientes con o bien enfermedad de Crohn activa o bien colitis ulcerosa activa, y controles sin inflamación intestinal, para detectar la expresión de CALGRANULINA C mediante anticuerpo anti-CALGRANULINA C de conejo. Se determinó la actividad de enfermedad en secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Se usó anticuerpo anti-antígeno CD15 asociado a granulocitos humano de ratón monoclonal (Dako, Hamburgo, Alemania), un marcador de neutrófilos sensible, para detectar neutrófilos en infiltrados. Se realizó la tinción en secciones en serie para detectar la expresión conjunta de CALGRANULINA C y CD15 en infiltrados. Para los controles, se emplearon IgM de ratón monoclonal (Dianova, Hamburgo, Alemania) e IgG de conejo policlonal (Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania) de especificidad irrelevante. Se usaron anticuerpos secundarios y sustratos para la reacción de coloración tal como se describió anteriormente (Rammes *et al.*, 1997, J Biol Chem 272: 9496-9502; Frosch *et al.*, 2000, Arthritis Rheum 43: 628-637). Se llevó a cabo la microscopía de inmunofluorescencia tal como se describió anteriormente para el ejemplo 5.

20 Los estudios inmunohistoquímicos en tejido de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria mostraron un patrón específico de expresión de CALGRANULINA C por células infiltrantes en zonas inflamadas mientras que no pudo encontrarse tinción en tejido de pacientes con enfermedad inactiva. Además, se encontró CALGRANULINA C en una distribución extracelular rodeando a células positivas para CALGRANULINA C, lo que refleja la secreción de CALGRANULINA C y posiblemente la unión a otras células que llevan el receptor en infiltrados. En tejido de pacientes con enfermedad de Crohn activa, se detectó CALGRANULINA C alrededor de lesiones granulomatosas (figura 12 A, B). En colitis ulcerosa, los abscesos crípticos consistían en una mayoría de células positivas para CALGRANULINA C (figura 12D). Células que transmigraron a través del epitelio hacia la luz también parecían ser positivas para CALGRANULINA C en enfermedad de Crohn así como en colitis ulcerosa. La tinción conjunta con anticuerpo anti-CD15 monoclonal demostró que la expresión de CALGRANULINA C se restringía a neutrófilos que se infiltraron en el tejido inflamado (figura 12H).

30 Conjuntamente, estos datos demuestran que la CALGRANULINA C es una proteína proinflamatoria que desempeña un papel predominante durante la enfermedad intestinal inflamatoria. Se expresa fuertemente en tejido inflamado de pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn activa, y los niveles circulantes de CALGRANULINA C parecen ser marcadores de inflamación fiables en la monitorización de la actividad de enfermedad. Además, los efectos beneficiosos de agentes bloqueantes en modelos murinos de colitis hacen que la CALGRANULINA C sea una diana atractiva para enfoques terapéuticos novedosos en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria.

Ejemplo 7: La CALGRANULINA C es útil como marcador para la actividad de enfermedad residual mínima en pacientes con artritis reumatoide juvenil (ARJ) después del primer tratamiento satisfactorio

40 Se determinaron las concentraciones de CALGRANULINA C en suero para 13 pacientes con artritis reumatoide juvenil pauciartricular y poliarticular que recibieron tratamiento con MTX para inducir remisión, y se investigaron retrospectivamente los datos para determinar la correlación con el riesgo de recaída. Se determinó la concentración de CALGRANULINA C en el momento en el que se documentó remisión según los criterios de ARJ. Se realizó la determinación de la concentración de CALGRANULINA C tal como se describió anteriormente usando un ELISA.

45 Se encontró que 6 pacientes que estuvieron en remisión estable durante más de 12 meses tenían niveles significativamente inferiores cuando se interrumpió el tratamiento con MTX que los de 7 pacientes que tuvieron una recaída antes de que hubieran pasado 12 meses (65 frente a 135 ng/ml de CALGRANULINA C; p<0,05; véase la figura 13). En cambio, el análisis de VSG y CRP no mostró diferencias entre estos pacientes y por tanto no eran adecuados para la predicción del riesgo de recaída. Por tanto, la CALGRANULINA C indica actividad de enfermedad

inflamatoria residual incluso en ausencia de otros signos clínicos o de laboratorio de inflamación en curso. Por tanto, es un marcador predictivo para la remisión estable, permitiendo un diagnóstico y tratamiento adecuados: los pacientes para los que se diagnostica un bajo riesgo de recaída no necesitan recibir MTX, que presenta efectos secundarios graves, mientras que a pacientes con alto riesgo de recaída se les administrará tratamiento con MTX adicional como medicación adecuada.

Ejemplo 8: Se secreta CALGRANULINA C por neutrófilos activados *in vitro*

Una de las características histológicas más prominentes que se observa en la colitis ulcerosa así como en la enfermedad de Crohn es la infiltración de neutrófilos en la mucosa inflamada en un punto de tiempo temprano de la inflamación (Nikolaus *et al.*, 1998, Gut 42: 470-476; Kucharzik *et al.*, 2001, Am J Pathol 159: 2001-2009). Recientemente, se ha mostrado que se secreta CALGRANULINA C por neutrófilos humanos activados (Boussac & Garin, 2000, Electrophoresis 21: 655-672).

Para comprobar adicionalmente la relación entre TNF alfa y CALGRANULINA C derivada de neutrófilos, pudo demostrarse que TNF alfa podía estimular la secreción de CALGRANULINA C en neutrófilos periféricos. Se aislaron neutrófilos de donantes mixtos humanos a partir de capas leucocíticas (Cruz Roja alemana, Münster, Alemania) tal como se describió anteriormente (Vogl *et al.*, 1999, J Biol Chem 274: 25291-25296). En resumen, se realizó centrifugación a través de Ficoll-Hypaque (Biocoll, Biochrom, Berlín, Alemania) para separar neutrófilos de células mononucleares y plaquetas. Se separaron los eritrocitos mediante sedimentación con dextrano. Se lavaron las células restantes dos veces en PBS. La pureza de las células era superior al 95%, tal como se determina mediante análisis morfológico de células teñidas con azul tripano. Se resuspendieron los neutrófilos a una concentración final de 1×10^7 células/ml en medio RPMI libre de suero (Biochrom, Berlín, Alemania) complementado con glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y penicilina/estreptomicina al 1%. Se indujo inmediatamente la secreción mediante la adición de TNF alfa (TNF alfa humano recombinante, Cell Biology Boehringer, Mannheim, Alemania) hasta una concentración final de o bien 2 o bien 5 ng/ml. Se incubaron células estimuladas y no estimuladas durante 15 ó 30 minutos a 37°C, respectivamente. Finalmente, se sedimentaron los neutrófilos a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante para análisis de CALGRANULINA C con ELISA de tipo "sándwich". Se evaluó la lisis celular analizando la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) usando esta capacidad para convertir NADH en NAD⁺ y midiendo la disminución de la absorbencia de NADH a 340 nm. Se añadieron inhibidores de proteasas para prevenir la degradación proteolítica.

Se determinó la secreción basal mínima de CALGRANULINA C en neutrófilos no estimulados. Las concentraciones de CALGRANULINA C en el sobrenadante de las células estaba entre 5 y 10 ng/ml en 3 experimentos independientes. Hubo un aumento dependiente de la dosis y el tiempo de la secreción de CALGRANULINA C tras la estimulación con TNF alfa. No hubo diferencias en la viabilidad y lisis celular entre los experimentos tal como se sometió a prueba mediante la actividad LDH.

La elevación altamente significativa de la proteína CALGRANULINA C derivada de neutrófilos subraya el importante papel de los neutrófilos durante la inflamación tal como la inflamación intestinal. Los neutrófilos pertenecen a la población de células efectoras muy tempranas que se infiltra en la mucosa y las células epiteliales intestinales alterando de ese modo la función de la barrera intestinal durante la enfermedad intestinal inflamatoria. Los niveles circulantes elevados de CALGRANULINA C sérica proporcionan pruebas de que los neutrófilos no sólo desempeñan un papel dentro del sistema inmunitario de la mucosa local, sino que también son importantes en respuestas inmunitarias sistémicas durante la enfermedad intestinal inflamatoria activa crónica.

En el presente documento se demuestra también que TNF alfa puede estimular la secreción de CALGRANULINA C en neutrófilos periféricos. Puesto que el TNF alfa apenas puede detectarse en suero y la CALGRANULINA C es una proteína extremadamente estable incluso a temperatura ambiente o tras múltiples ciclos de congelación y descongelación, el análisis de CALGRANULINA C sérica puede proporcionar un excelente marcador para la evaluación de la respuesta al tratamiento anti-TNF alfa.

Lista de secuencias

<110> Clemens Sorg y Johannes Roth

<120> Método para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias usando calgranulina C

<130> S30274PCT

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 466

<212> ADN

ES 2 394 962 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

accactgctg gctttttgct gtagctccac attcctgtgc attgaggggt taacattagg      60
ctgggaagat gacaaaactt gaagagcatc tggaggggaat tgtcaatata ttccaccaat    120
actcagttcg gaagggggcat tttgacaccc tctctaaggg tgagctgaag cagctgctta    180
caaaggagct tgcaaacacc atcaagaata tcaaagataa agctgtcatt gatgaaatat    240
tccaaggcct ggatgctaata caagatgaac aggtcgactt tcaagaattc atatccctgg    300
tagccattgc gctgaaggct gccattacc acaccacaa agagtaggta gctctctgaa    360
ggctttttac ccagcaatgt cctcaatgag ggtcttttct ttccctcacc aaaaccagc     420
cttgcccgtg gggagtaaga gttaataaac aactcacga aaagtt                       466

```

5

<210> 2

<211> 92

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 2

```

Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
1          5          10          15

Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
          20          25          30

Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
          35          40          45

Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
50          55          60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
65          70          75          80

Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
          85          90

```

15

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias seleccionadas de artritis reumatoide, artritis seronegativa, artritis juvenil y artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico (ARJS), que comprende las etapas de
- 5 a) determinar la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C en una muestra de suero de un paciente; y
b) comparar la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C determinada en dicha muestra de suero con la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C determinada en una muestra control de suero,
- 10 en el que un aumento en la cantidad de polipéptido de calgranulina C en la muestra de suero en comparación con la muestra control es indicativo de dicha enfermedad.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se usa un anticuerpo específico para determinar la cantidad y/o concentración de polipéptido de calgranulina C.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo específico reconoce un epítipo derivado de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2.
4. Método según las reivindicaciones 2 ó 3, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que comprende antisuero policlonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla y diacuerpos.
- 20 5. Método según las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho anticuerpo se usa para llevar a cabo un inmunoensayo tal como un ELISA o una técnica inmunohistoquímica.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad es artritis juvenil, y comprendiendo además dicho método identificar el riesgo de recaída tras el primer tratamiento satisfactorio.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad es artritis reumatoide juvenil de comienzo sistémico (ARJS), y comprendiendo además dicho método una discriminación de la infección bacteriana.

FIG. 1

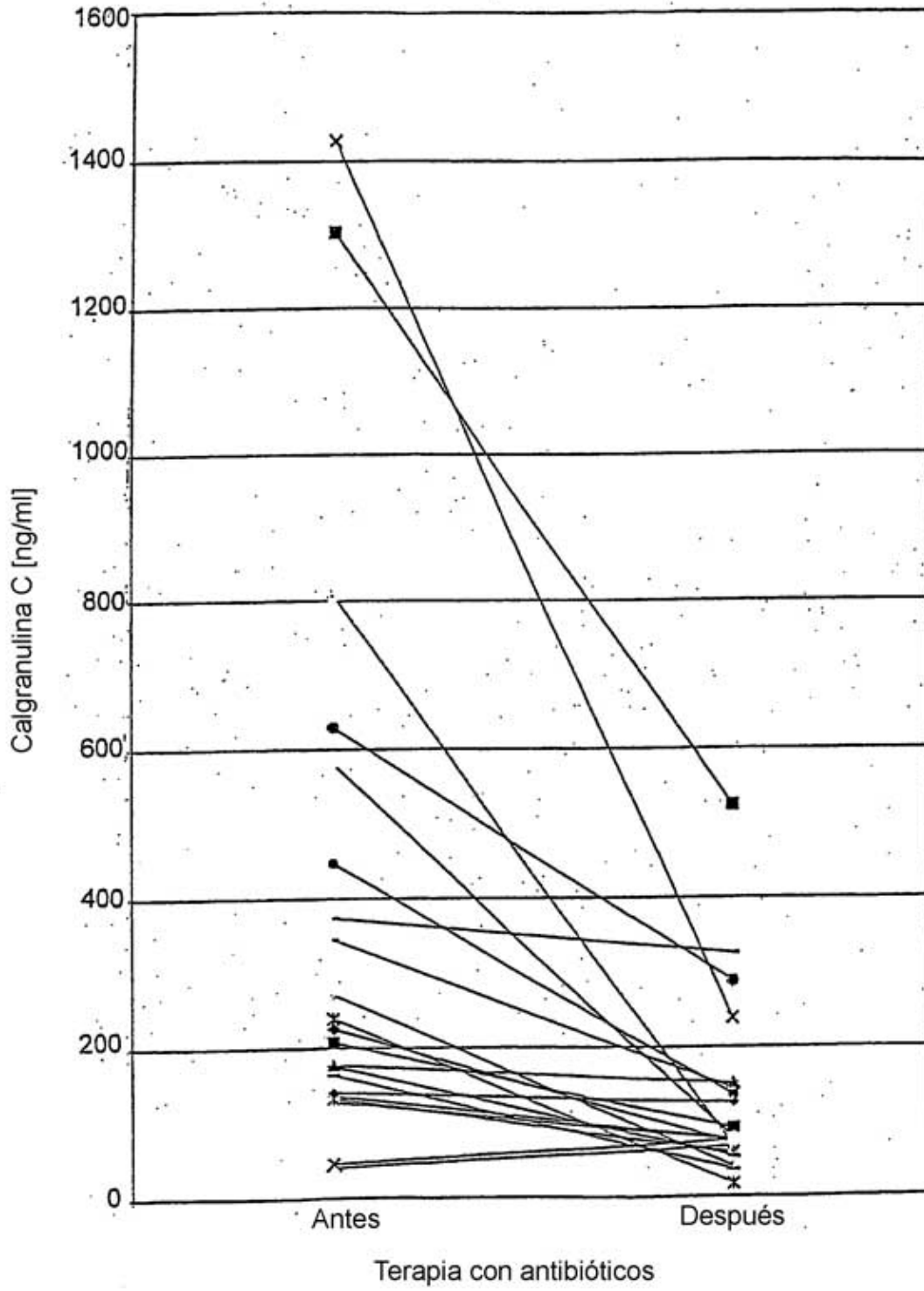
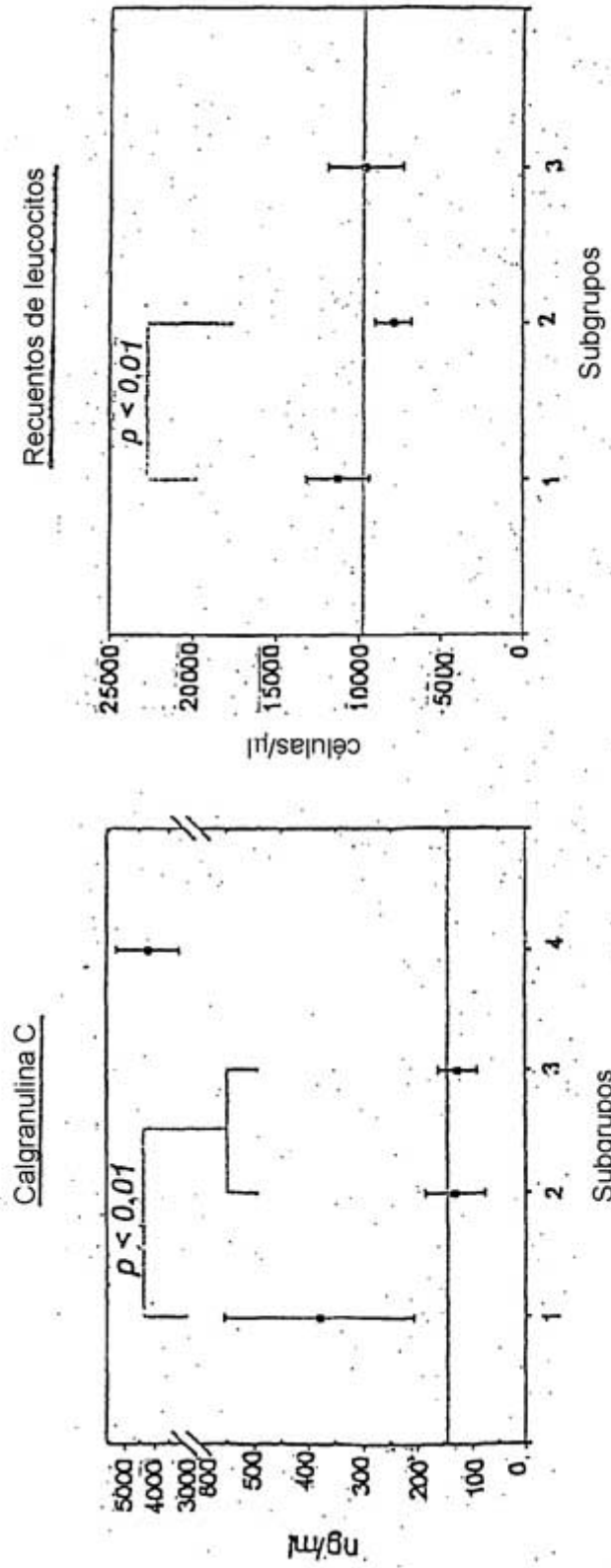


FIG. 2



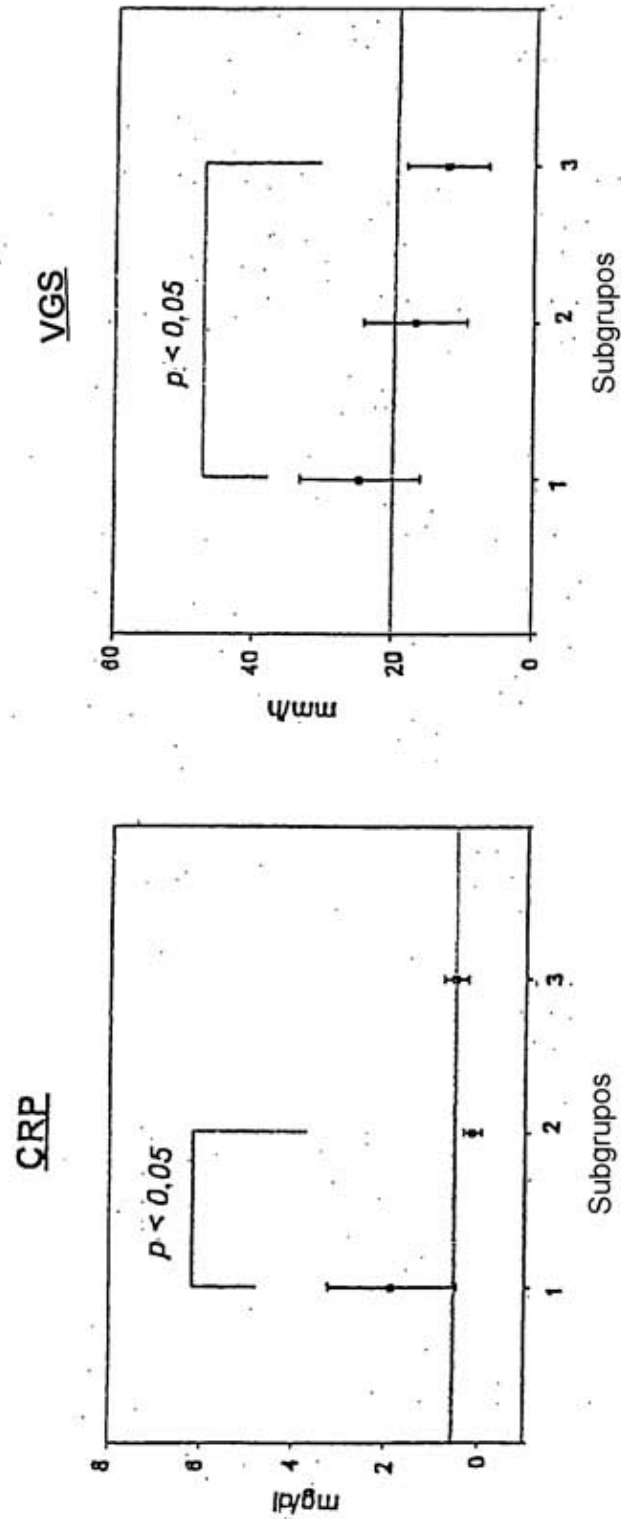


FIG. 3

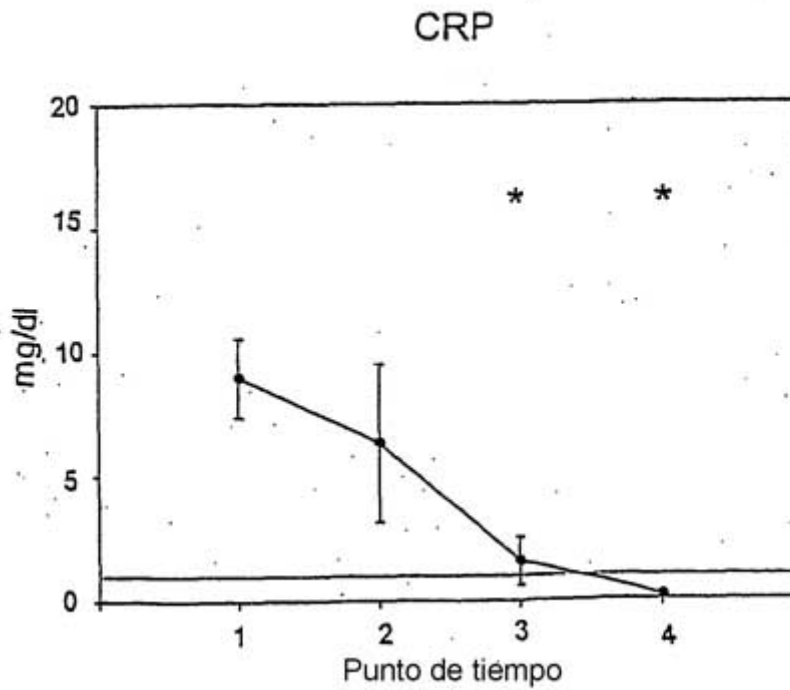
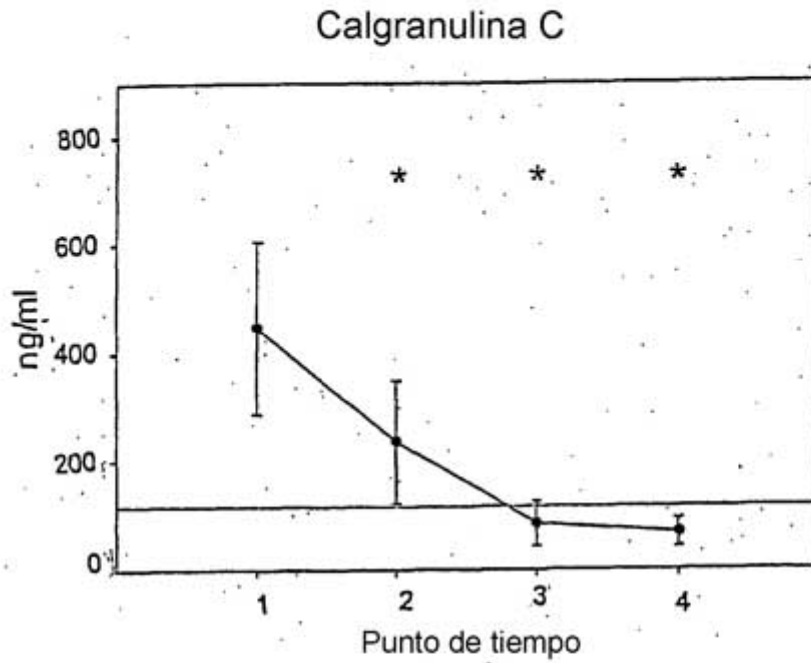


FIG. 4

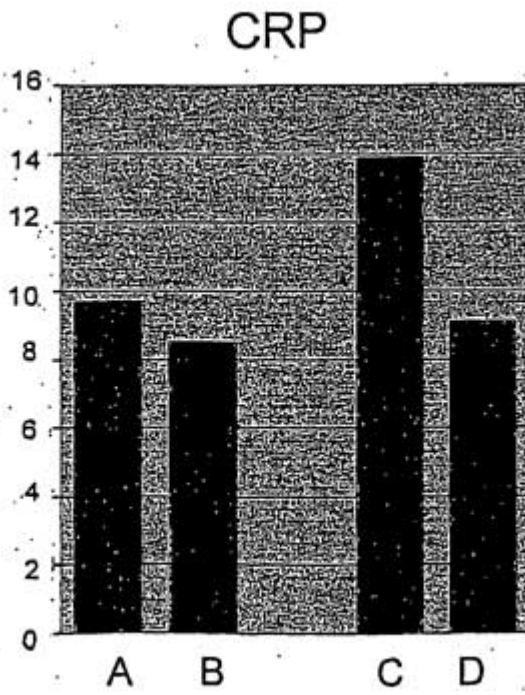
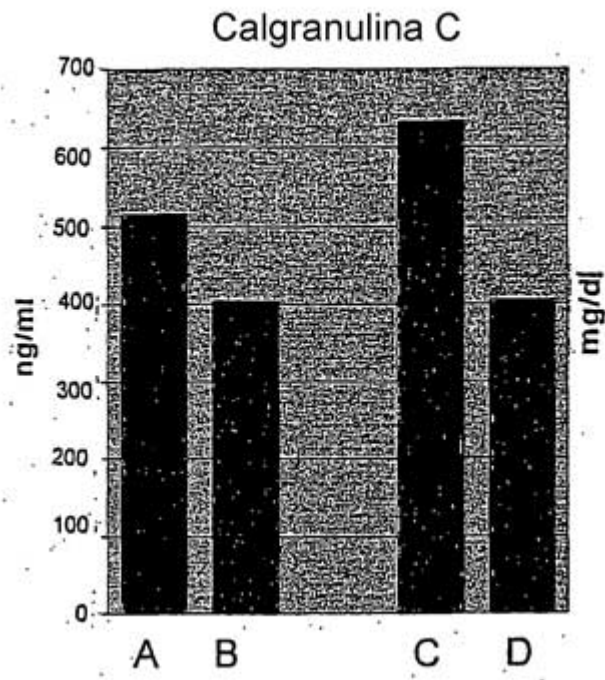


FIG. 5

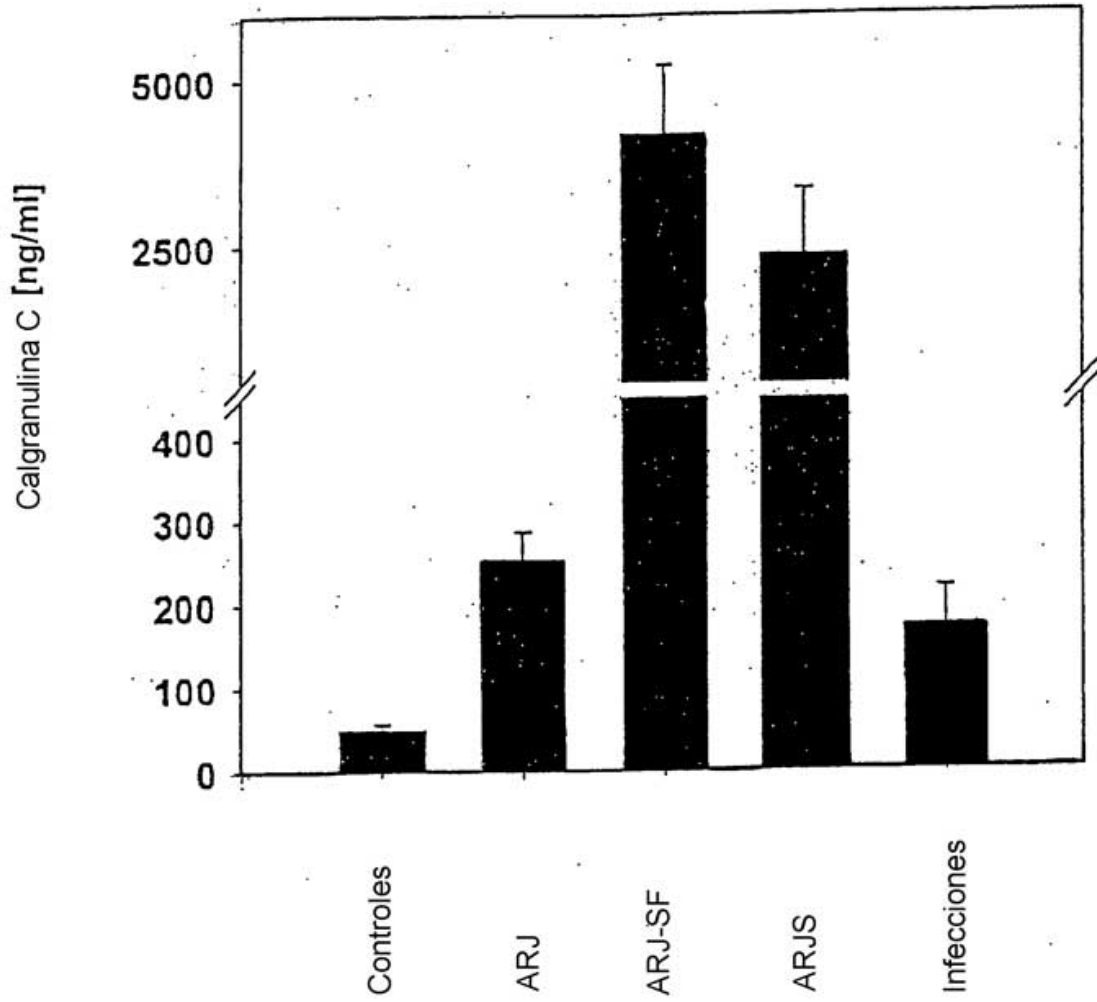
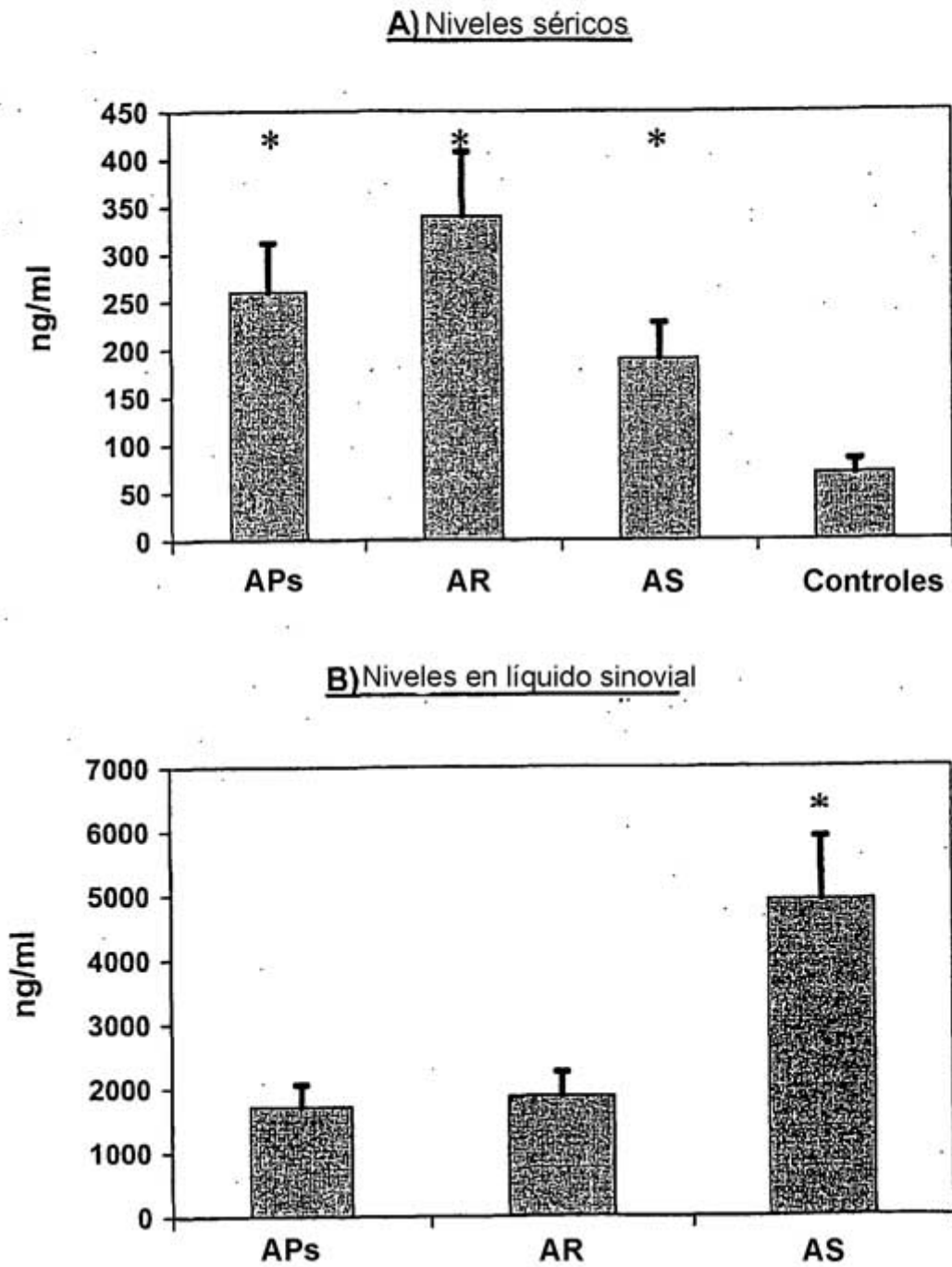


FIG. 6



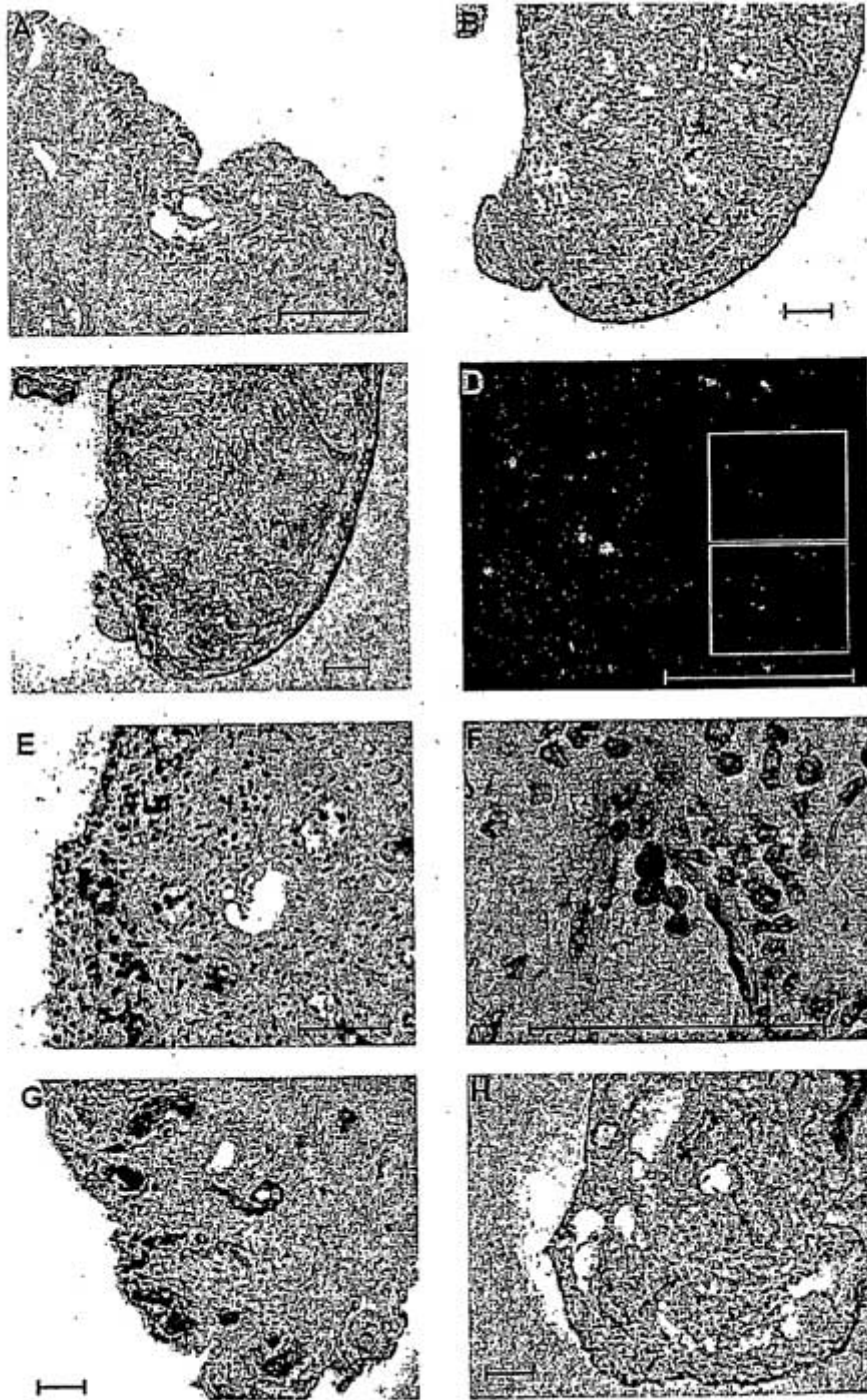


FIG. 7

FIG. 8

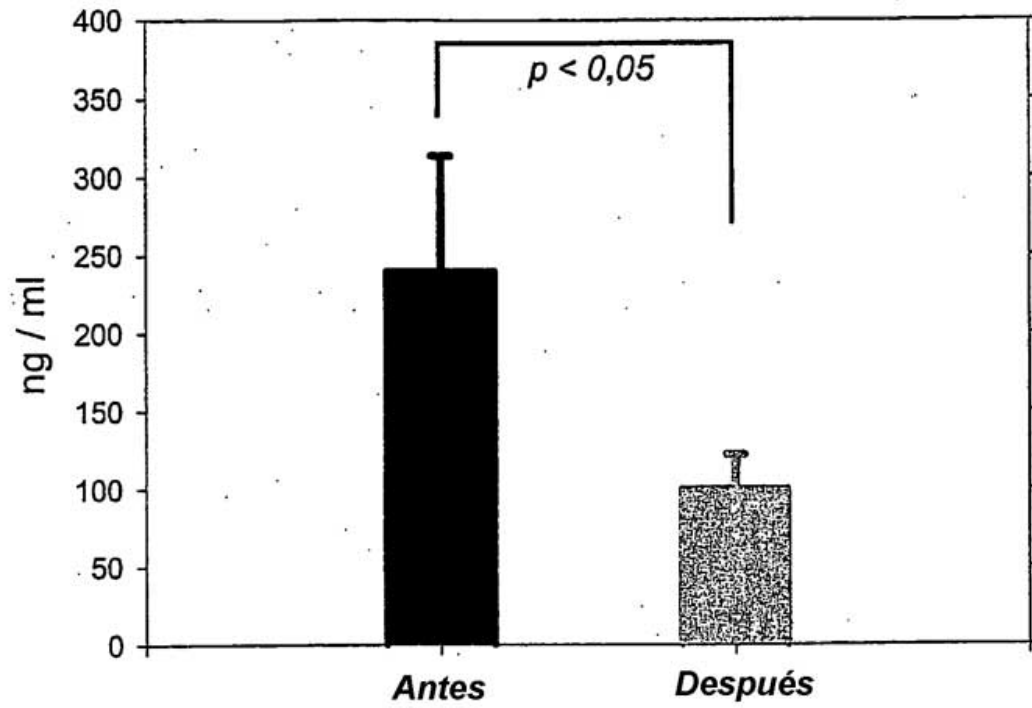


FIG. 9

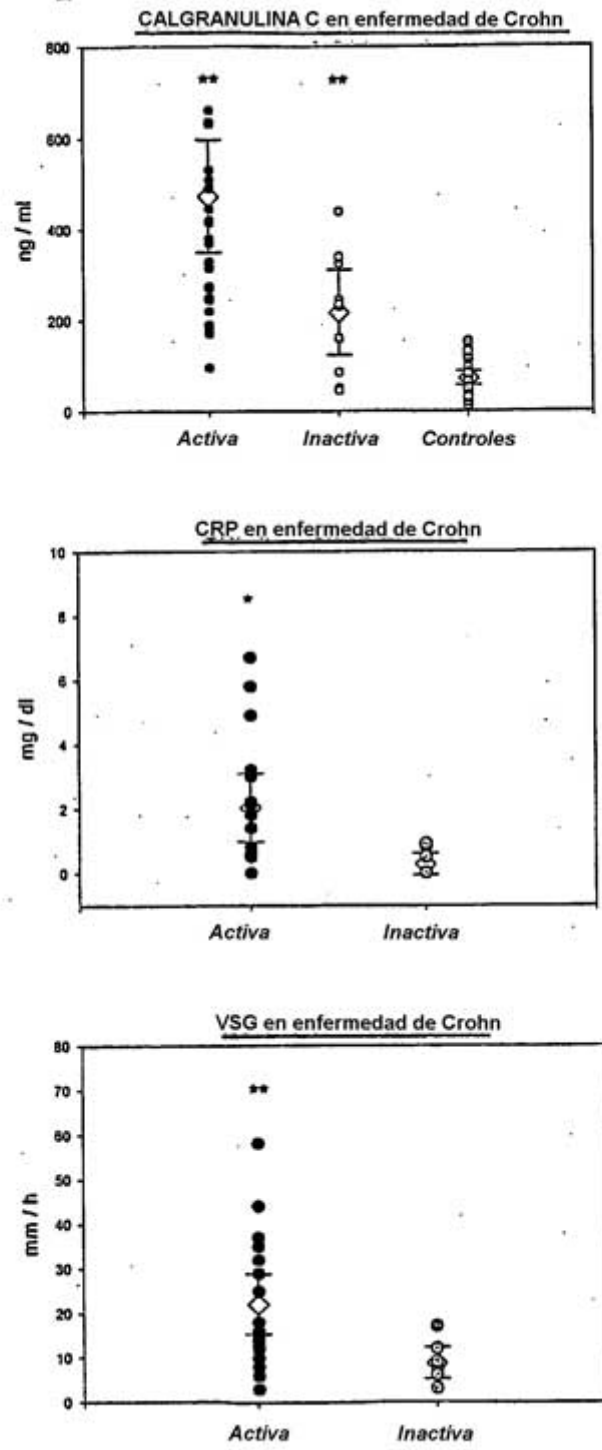


FIG. 9 (continuación)

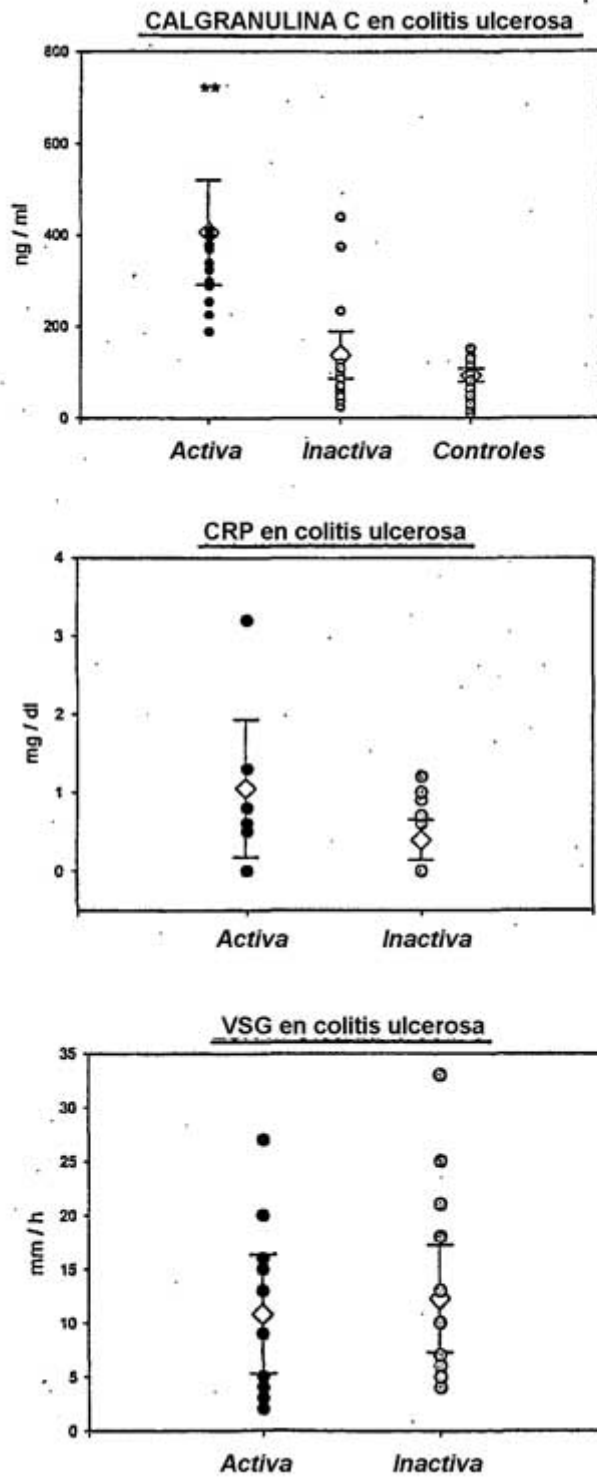
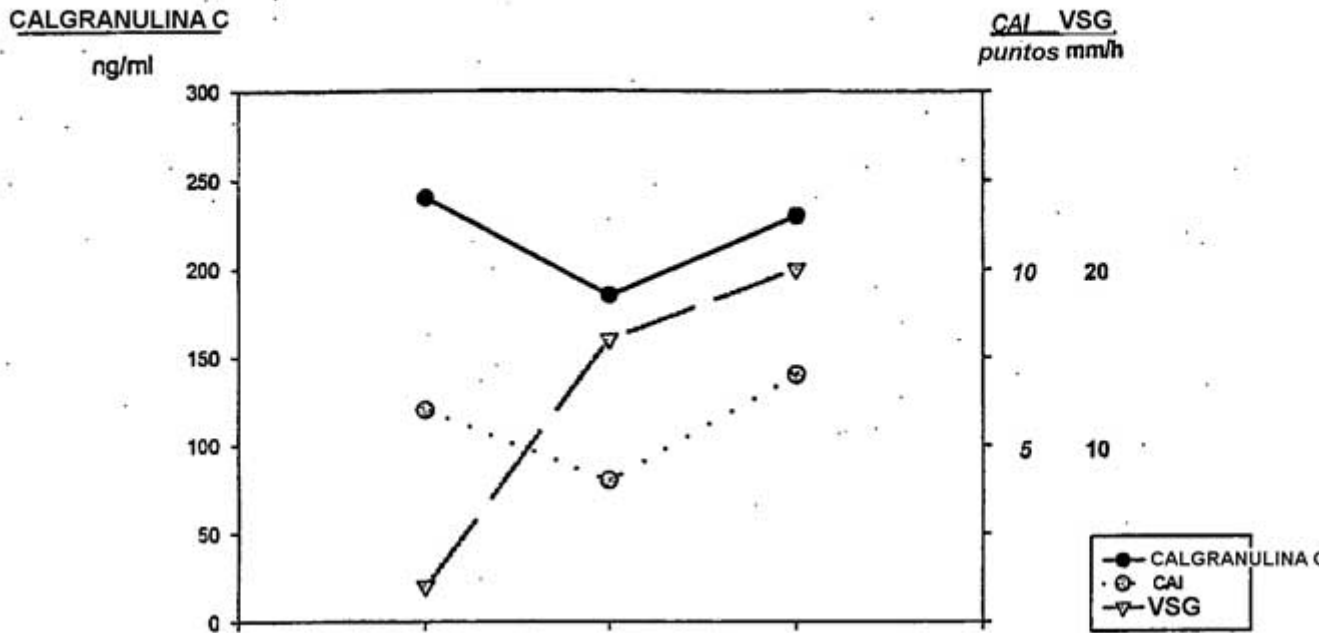
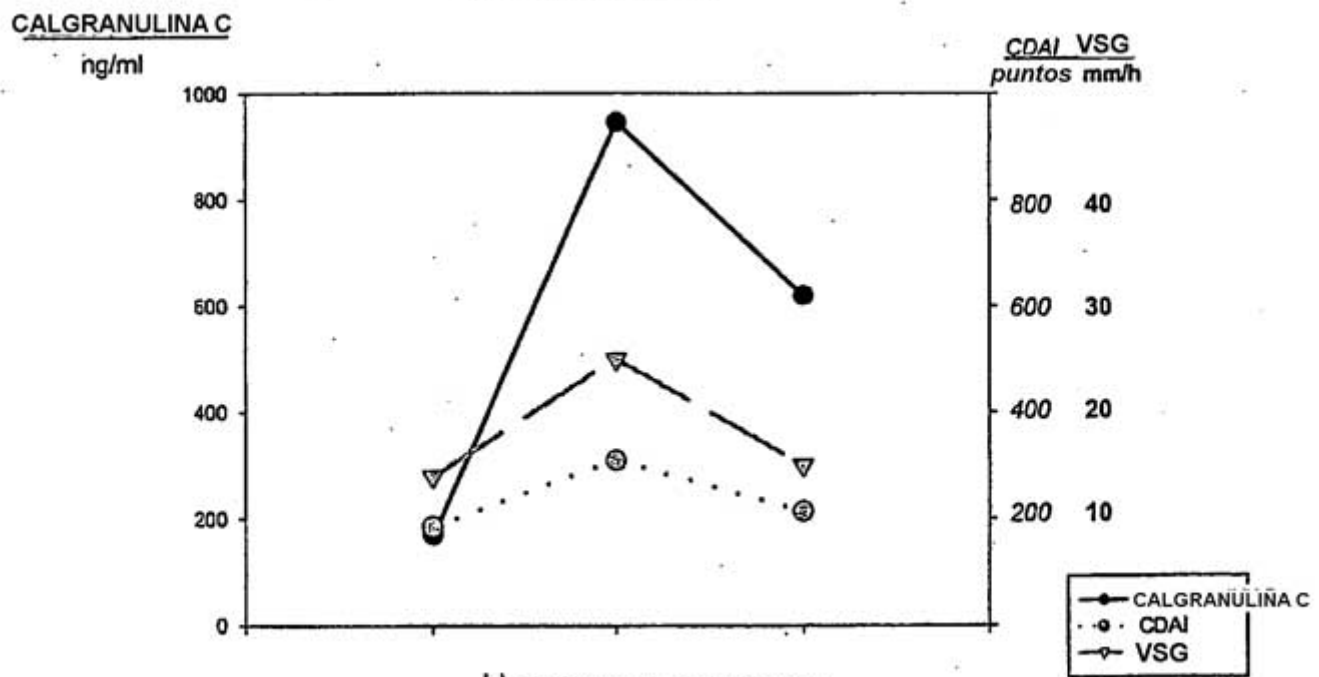


FIG. 10

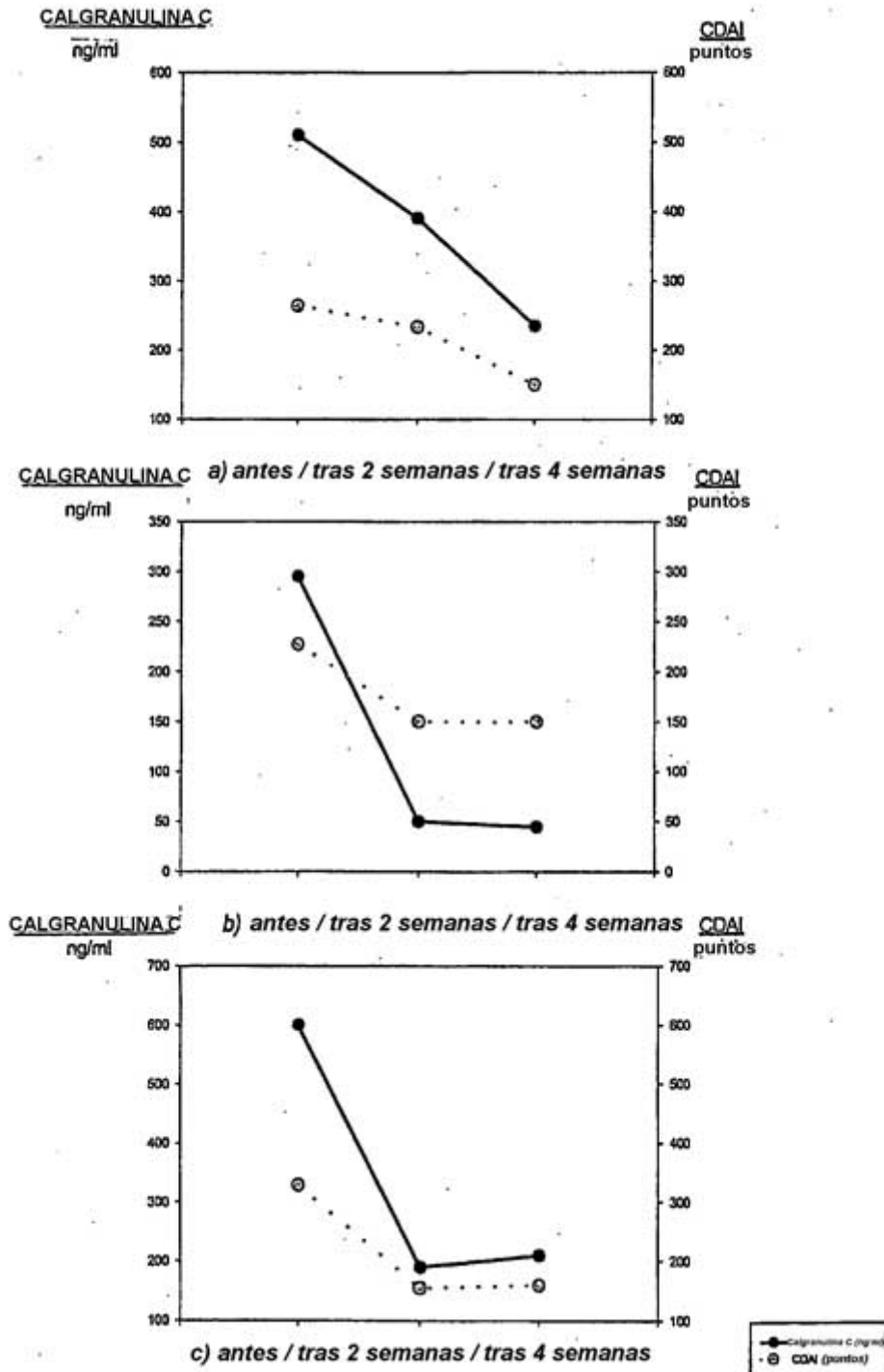


a) Colitis ulcerosa



b) Enfermedad de Crohn

FIG. 11



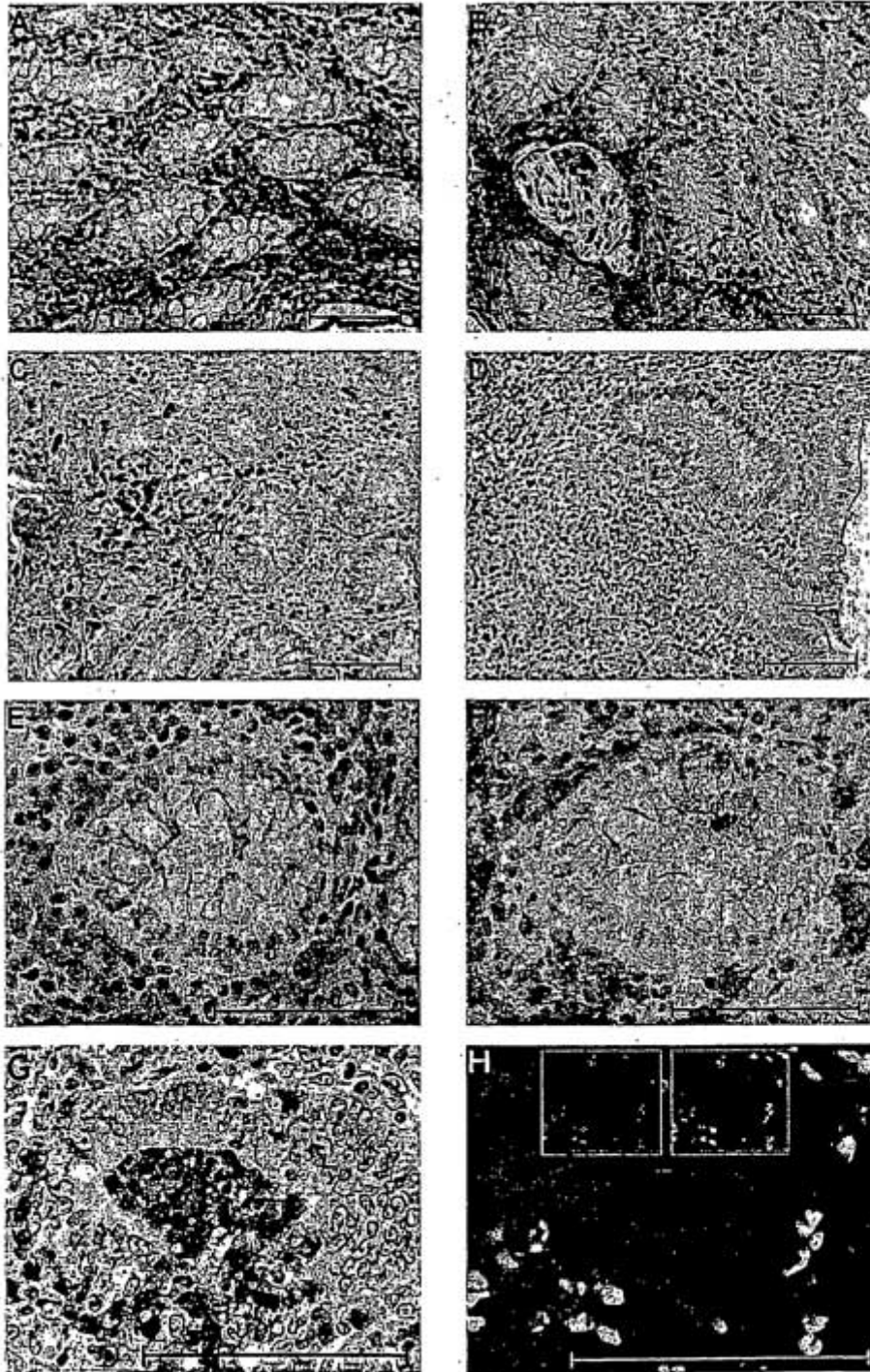
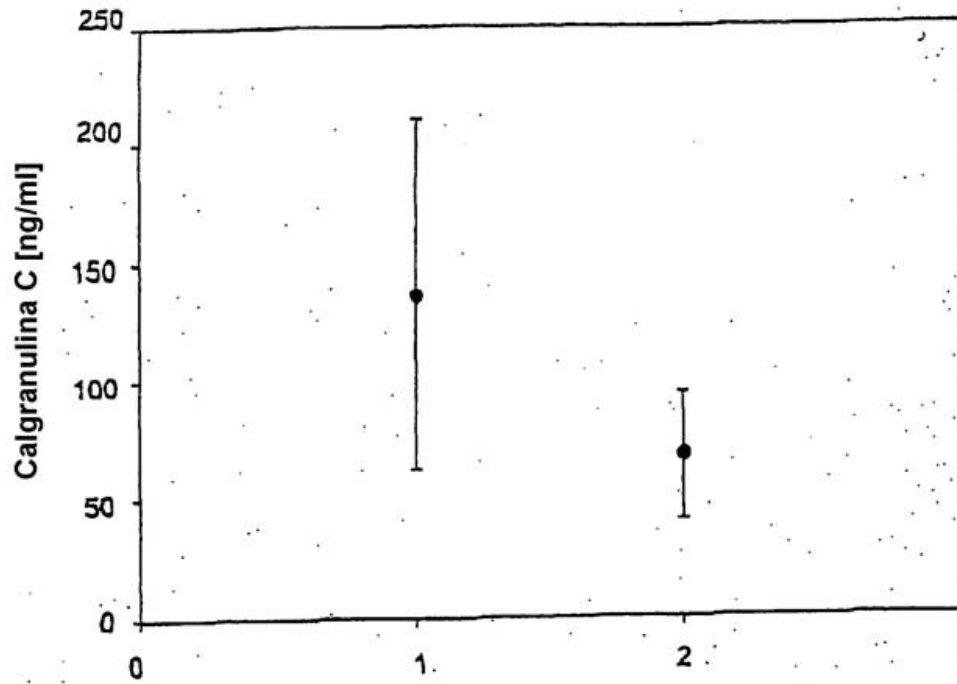


FIG. 12

FIG. 13



1 = Pacientes con remisión durante 1-12 meses (n = 7)

2 = Pacientes con remisión durante más de 12 meses (n = 6)

FIG. 14

CALGRANULINA C en sobrenadante

