

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 995**

51 Int. Cl.:

G01N 30/88 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07743692 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2034305**

54 Título: **Método para la determinación de la enfermedad inflamatoria intestinal**

30 Prioridad:

19.05.2006 JP 2006140457

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

22.11.2013

73 Titular/es:

**LSIP, LLC (100.0%)
7-12, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**MIYOSHI, EIJI;
IIJIMA, HIDEKI;
SHINZAKI, SHINICHIRO;
TSUJII, MASAHIKO;
HAYASHI, NORIO;
NAKAGAWA, TAKATOSHI;
KONDO, AKIHIRO;
TANIGUCHI, NAOYUKI;
MIYOSHI, EIJI;
IIJIMA, HIDEKI;
SHINZAKI, SHINICHIRO;
TSUJII, MASAHIKO;
HAYASHI, NORIO;
NAKAGAWA, TAKATOSHI;
KONDO, AKIHIRO y
TANIGUCHI, NAOYUKI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 430 995 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 para la determinación de la enfermedad inflamatoria intestinal

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal. Más detalladamente, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal.

10

Antecedentes de la técnica

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), es una de las enfermedades incurables, y hay aproximadamente 120 mil pacientes con EII en Japón. Hoy en día, el diagnóstico diferencial entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en un paciente con EII se lleva a cabo principalmente por las características patológicas, entre las que se incluyen el aspecto específico observado mediante el enema de bario, la observación endoscópica, la presencia o ausencia de granulomas de células epitelioides, así como las características clínicas que incluyen la presencia o la ausencia de sangre en las heces y de lesiones perianales. Estos criterios requieren una endoscopia, lo que supone una gran molestia para el paciente que está siendo diagnosticado. Se ha deseado un método no invasivo y objetivo para el diagnóstico diferencial de un paciente con la enfermedad inflamatoria intestinal.

La inmunoglobulina G (de aquí en adelante, IgG) es una glucoproteína, y constituye aproximadamente el 75-85 % de las inmunoglobulinas séricas en seres humanos normales. Como se muestra en la Figura 1, la IgG es una molécula simétrica formada por dos cadenas H idénticas y dos cadenas L idénticas.

La IgG porta oligosacáridos en su fragmento Fc, y el oligosacárido desempeña un papel importante en el mantenimiento de la estructura estérica de la IgG. Además, el oligosacárido afecta a la interacción entre la IgG y el receptor Fcγ o moléculas efectoras tales como complementos. Se conocen dieciséis oligosacáridos de IgG, que se muestran en la Figura 2.

En las personas sanas, las cantidades relativas entre los 16 oligosacáridos de IgG son aproximadamente constantes. Sin embargo, el equilibrio entre los oligosacáridos es específico de los pacientes con mieloma o artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, los pacientes con artritis reumatoide tienen niveles significativamente aumentados de inmunoglobulina G (IgG) agalactosilada en suero, que carece de la galactosa terminal en el oligosacárido de IgG. Se ha propuesto un método para el diagnóstico de la AR basado en este hallazgo (documento de no patente 1), y se han desarrollado métodos para determinar la proporción relativa de los oligosacáridos (documento de patente 1) y para la detección de autoanticuerpos contra la IgG agalactosilada (CARF) sérica (documento de no patente 2). Aunque CARF se correlaciona con la actividad patológica de la AR, se ha puesto de manifiesto que CARF no refleja necesariamente la cantidad de IgG agalactosilada sérica.

Se ha propuesto el diagnóstico basado en la alteración del oligosacárido de IgG para diagnosticar la afección del SIDA (documento de patente 2), enfermedades hepáticas, hipertensión maligna, nefropatía por inmunoglobulina A y enfermedades infantiles (documento de patente 3). Especialmente, se ha informado del aumento de la IgG agalactosilada sérica en pacientes con enfermedades inflamatorias (documento de no patente 3), y entre las enfermedades inflamatorias, el aumento de la IgG agalactosilada sérica es significativo en pacientes con enfermedades autoinmunes. Se ha sugerido que las citoquinas de la fase aguda, tales como TNF e IL-6, participan en el mecanismo de aumento de la IgG agalactosilada en un paciente con dicha enfermedad. Sin embargo, todavía no se han divulgado los detalles de dicha información. Se ha publicado que la IgG agalactosilada del suero de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa es mayor que en el suero de personas sanas. También se ha sugerido que la cantidad de IgG agalactosilada sérica se correlaciona con la proteína C reactiva (PCR) y la actividad clínica (documentos no de patente 4 y 5). Sin embargo, estos informes se hicieron sobre la proporción de oligosacárido de IgG agalactosilada en todas las fracciones de oligosacárido de IgG en suero. Todavía no se ha publicado ningún estudio sobre la correlación de la relación entre los oligosacáridos de IgG específicos y la EII.

[Documento de Patente 1] JP 8-220099 A;
 [Documento de Patente 2] JP 7-209301 A;
 [Documento de Patente 3] JP 8-82623 A;
 [Documento no de Patente 1] TAKARA BIO ONLINE CATALOGUE "Method for analyzing human IgG oligosaccharides using PALSTATION®";
 [Documento no de Patente 2] "Package insert of PICOLUMI® CARF, a diagnosing kit for the determination serum anti-agalactosy IgG antibodies";
 [Documento no de Patente 3] Thomas W. Rademacher *et al.*, *Springer Semin Immunopathol*, Vol. 10, 231-249 (1998);
 [Documento no de Patente 4] R. Dube *et al.*, *Gut*, Vol. 31, 431-434 (1990);

65

[Documento no de Patente 5] Mae F. Go *et al.*, *J. Clin. Gastroenterol.* Vol 18, 86-87 (1994).

Tsuchiya *et al.* divulgan un ensayo para diferenciar la IgG agalacto de la IgG glucosilada de manera normal. El porcentaje de G0 se determinó usando una columna de proteína G o la captura de IgG usando proteína G en fase sólida (véase, por ejemplo, la Figura 2). Se observó que los pacientes con enfermedad de Crohn tenían una unión a PVL mayor (IgG agalacto superior) que los pacientes normales.

Parekh *et al* divulgan la relación entre los pacientes enfermos (por ejemplo, con enfermedad de Crohn, véase la Figura 20) y la presencia de IgG agalacto.

Dube *at al* describen la ausencia de galactosa en los polisacáridos de IgG en pacientes que sufren la enfermedad intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa).

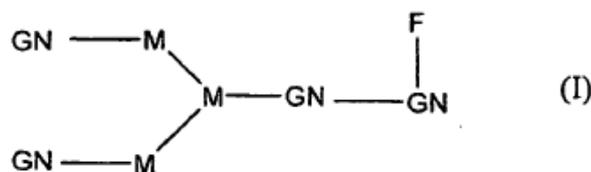
Divulgación de la invención

Problema/s por resolver mediante la invención

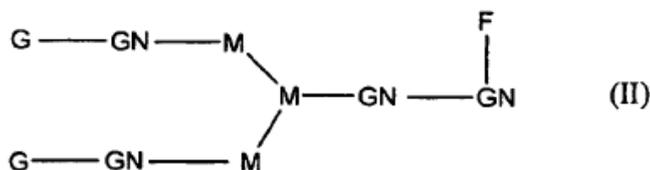
Un objeto de la invención es proporcionar un método objetivo y no invasivo para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Medios para resolver el/los problema/s

La invención proporciona un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal que comprende: determinar la proporción relativa del oligosacárido G0 mostrado mediante la fórmula (I):



con respecto al oligosacárido G2 mostrado mediante la fórmula (II):



donde G representa galactosa, M representa manosa, GN representa N-acetilglucosamina y F representa fucosa en la fracción de oligosacáridos de IgG sérica obtenida de un paciente con la enfermedad inflamatoria intestinal o un paciente sospechoso de padecer la enfermedad inflamatoria intestinal; y diferenciar la enfermedad inflamatoria intestinal basándose en la proporción obtenida.

De acuerdo con el método de la presente invención, se determina la proporción de la cantidad de oligosacárido G0 representado por la fórmula (I) con respecto a la cantidad de oligosacárido G2 representado por la fórmula (II) (G0/G2). Cuando la proporción es superior a un valor predeterminado, al paciente se le diagnostica la enfermedad de Crohn, mientras que cuando la proporción es inferior a un valor predeterminado, al paciente se le diagnostica colitis ulcerosa.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, se hace posible el diagnóstico diferencial entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en un paciente con enfermedad intestinal inflamatoria o un paciente sospechoso de padecer la enfermedad inflamatoria intestinal. El método de la presente solicitud usa sangre periférica obtenida del paciente y, por tanto, causa menores molestias al paciente que el diagnóstico diferencial convencional, que requiere la observación endoscópica. Más particularmente, el método de la invención puede determinar si un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal tiene colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En el diagnóstico diferencial convencional entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, el diagnóstico se ha llevado a cabo de una manera integral basándose en los hallazgos del enema de bario, el aspecto endoscópico, los hallazgos histológicos, incluyendo la presencia o ausencia de granulomas epitelioides, además de la presencia o ausencia de sangre en las heces y de lesión perianal. De acuerdo con la presente invención, el diagnóstico diferencial entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal se puede llevar a cabo usando sangre periférica obtenida del paciente al que se ha diagnosticado enfermedad inflamatoria intestinal mediante observaciones clínicas no invasivas tales como la presencia o ausencia de sangre en las heces y de lesión perianal.

El método de la presente invención puede reducir significativamente las molestias físicas y psicológicas del paciente causadas por el diagnóstico diferencial convencional. Además, la proporción de G0/G2 usada en la presente invención también es útil como marcador para determinar el pronóstico de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

5

Breve explicación de las figuras

[Fig. 1] Estructura esquemática del anticuerpo IgG.

[Fig. 2] Estructuras de 16 oligosacáridos unidos a IgG.

10 [Fig. 3] Correspondencia entre los picos de HPLC y los oligosacáridos mostrados en la Fig. 2.

[Fig. 4] Determinación de G0/G2 en función del perfil de HPLC.

[Fig. 5] Perfil de HPLC representativo de oligosacáridos de IgG obtenidos de un control sano.

[Fig. 6] Perfil de HPLC representativo de oligosacáridos de IgG obtenidos de un paciente con enfermedad de Crohn.

15 [Fig. 7] Perfil de HPLC representativo de oligosacáridos de IgG obtenidos de un paciente con colitis ulcerosa.

[Fig. 8] Distribuciones de G0/G2 de los pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

[Fig. 9] Distribuciones de G0/G2 de los pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

20 [Fig. 10] Correlación entre G0/G2 y las actividades clínicas o la zona lesionada en pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU).

[Fig. 11A] Tasa positiva/negativa de la IgG agalactosil (aGAL) en pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), así como en los controles sanos (CS).

25 [Fig. 11B] Curva ROC para G0/G2 y niveles de ACSC para la diferenciación entre pacientes con enfermedad de Crohn y los controles sanos.

[Fig. 11C] Curva ROC para G0/G2 y niveles de ACSC para la diferenciación entre pacientes con enfermedad de Crohn y con colitis ulcerosa.

[Fig. 11D] Correlación entre ACSC y G0/G2 en pacientes con enfermedad de Crohn.

[Fig. 11E] Correlación entre ACSC y G0/G2 en pacientes con colitis ulcerosa.

30 [Fig. 12] Perfil de HPLC representativo de oligosacáridos de IgG obtenidos de un paciente tanto con artritis reumatoide como con colitis ulcerosa.

[Fig. 13A] Expresión de ARNm de β 4GalT I relativa en células plasmáticas de pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

35 [Fig. 13B] Expresión de ARNm de β 4GalT I relativa en linfocitos B de pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

[Fig. 13C] Actividad enzimática de β 4GalT I en células plasmáticas de pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

[Fig. 14] Cantidad de anticuerpo contra IgG agalactosilada en suero de pacientes con enfermedad de Crohn (EC), con colitis ulcerosa (CU) y controles sanos (CS).

40

Mejor modo de llevar a cabo la presente invención

De acuerdo con el método de la presente invención, se usa suero obtenido de la sangre periférica del paciente. En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones de la presente solicitud, las expresiones "paciente con enfermedad inflamatoria intestinal" o "paciente sospechoso de padecer la enfermedad inflamatoria intestinal" se refieren a un paciente a quien ya le han diagnosticado enfermedad inflamatoria intestinal basándose en criterios clínicos convencionales para la enfermedad inflamatoria intestinal o un paciente del que se sospecha a nivel clínico que padece la enfermedad inflamatoria intestinal según criterios clínicos convencionales para la enfermedad inflamatoria intestinal.

50

De acuerdo con el método de la presente invención, se examinan las estructuras de los oligosacáridos de IgG del suero obtenidos de la sangre periférica del paciente. El suero del paciente se puede obtener de la sangre periférica mediante cualquier procedimiento usado en los exámenes clínicos.

55 Se purifica la IgG del suero y se analizan los oligosacáridos unidos a la IgG. Como se divulga en los documentos no de patente 1 y 3, se conocen varios procedimientos para analizar el perfil de oligosacáridos de IgG. En el método de la presente invención, se puede emplear cualquier procedimiento siempre y cuando pueda determinar la proporción relativa del oligosacárido G0 representado por la fórmula (I) con respecto al oligosacárido G2 representado por la fórmula (II) de los oligosacáridos de IgG séricos. Por ejemplo, se puede emplear un procedimiento que comprende las etapas de: aislar y marcar los oligosacáridos, y analizarlos con HPLC para determinar la proporción relativa del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2.

60

En una realización, el método de la presente invención comprende las etapas de:

- 65 1) aislar inmunoglobulina G del suero de un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal;
2) liberar los oligosacáridos de la inmunoglobulina G;

- 3) medir la proporción relativa entre el oligosacárido G2 y el oligosacárido G0; y
- 4) diferenciar la enfermedad inflamatoria intestinal basándose en la proporción obtenida.

5 Cada etapa del método se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido. Por ejemplo, el perfil de oligosacáridos de IgG de un paciente se puede obtener mediante el aislamiento de la IgG del suero usando proteína A, la separación de los oligosacáridos de la IgG usando *N*-glucanasa, el marcaje de los oligosacáridos con fluorescencia y el análisis de los oligosacáridos marcados por HPLC para dar el perfil.

10 La presente realización se describirá más detalladamente. La proteína A se une específicamente a IgG. Las columnas rellenas con un vehículo al que se une la proteína A están disponibles en el mercado y la IgG se puede aislar mediante la carga del suero en dicha columna.

15 Los oligosacáridos se separan de la IgG aislada. La separación de los oligosacáridos se puede llevar a cabo por medio de procedimientos químicos tales como hidrazinolisis y *N*-acetilación, o procedimientos enzimáticos usando una enzima tal como la *N*-glucanasa. En el presente método, se puede emplear cualquiera de estos procedimientos. A continuación, se tratan los oligosacáridos separados de IgG, dando oligosacáridos piridilaminados (PA). Los oligosacáridos PA se someten a análisis HPLC usando una columna disponible en el mercado para el análisis de oligosacáridos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 En la Figura 3, se muestra el perfil de HPLC de los oligosacáridos de IgG. En la Figura 3, los picos correspondientes a los respectivos oligosacáridos mostrados en la Figura 2 se indican con los mismos alfabetos que en la Figura 2. El concepto básico para la determinación de G0/G2 se muestra en la Figura 4. En esta realización, la proporción de alturas de los picos del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2 se usa como la cantidad relativa del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2.

25 En otra realización de la presente invención, se pueden preparar el anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G0) y el anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G2) y se puede determinar el perfil de oligosacáridos de IgG en el suero del paciente usando estos anticuerpos por medio de un método convencional tal como ELISA. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales siempre que puedan diferenciar la IgG (oligosacárido G0) de la IgG (oligosacárido G2) y determinar su cantidad relativa. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos, así como para la realización de ELISA se conocen bien en la técnica, pudiéndose emplear cualquiera de esos métodos conocidos.

30 De acuerdo con la presente invención, el diagnóstico diferencial en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal se lleva a cabo basándose en la proporción así obtenida del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2 en el suero obtenido del paciente. Cuando la proporción de G0 con respecto a G2 (G0/G2) es superior a un valor predeterminado, al paciente se le diagnostica la enfermedad de Crohn o que es sospechoso de padecer la enfermedad de Crohn. Cuando la proporción de G0 con respecto a G2 (G0/G2) es inferior a un valor predeterminado, al paciente se le diagnostica colitis ulcerosa o que es sospechoso de padecer la colitis ulcerosa.

40 Además, la proporción de G0/G2 superior en un paciente significa la mayor gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal en el paciente o que se espera la mayor gravedad en el futuro.

45 En este contexto, el "valor predeterminado" se determinará tras fijar el protocolo para la medición del perfil de oligosacáridos de IgG. El valor se establece basándose en las proporciones de G0/G2 en el suero obtenidos de pacientes que ya se distinguían por tener la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa según los criterios de diferenciación convencionales y las del suero obtenido de voluntarios sanos por el protocolo establecido.

50 Por ejemplo, en el método descrito en el ejemplo de trabajo de la presente memoria descriptiva, en el que los oligosacáridos de IgG se aíslan de IgG y la cantidad relativa del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2 (G0/G2) se determina como la proporción de las alturas de los picos de HPLC correspondientes a los respectivos oligosacáridos, a un paciente con la enfermedad inflamatoria intestinal con una G0/G2 igual o superior a 1,5, preferentemente, igual o superior a 2,0 y, especialmente, igual o superior a 2,1 se le diagnosticará la enfermedad de Crohn o que es sospechoso de padecer la enfermedad de Crohn. Por otro lado, a un paciente con la enfermedad inflamatoria intestinal con una G0/G2 inferior a 2,1, preferentemente inferior a 2,0 y más preferentemente, inferior a 1,5 se le diagnosticará colitis ulcerosa o que es sospechoso de padecer colitis ulcerosa. Este valor no está limitado y los médicos obtendrán un valor más fiable con la acumulación de los datos obtenidos de un mayor número de pacientes de acuerdo con el mismo protocolo.

60 Se sabe que los pacientes con artritis reumatoide tienen niveles significativamente aumentados de IgG agalactosilada sérica. También se sabe que los pacientes con otra enfermedad inflamatoria tienen perfiles alterados de oligosacáridos de IgG. Por lo tanto, tras realizar el diagnóstico diferencial en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal mediante la presente invención, se deberían considerar las enfermedades relacionadas.

65 En otra realización de la presente invención, cuando la proporción de G0/G2 en un paciente con la enfermedad inflamatoria intestinal es inferior a un valor predeterminado, el pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal se predice como bueno. En esta realización, el "valor predeterminado" se determinará basándose en la proporción de

G0/G2 en el suero obtenido de los voluntarios sanos. Por ejemplo, el valor predeterminado puede ser la media \pm 2DE de las proporciones de G0/G2 en los sueros obtenidos de voluntarios sanos. Un ejemplo del valor en esta realización es 1,4. Sin embargo, como se ha tratado anteriormente, este valor no se limita a ninguno en particular.

5 El kit de la presente invención para llevar a cabo el método de la invención comprende agentes para medir las cantidades de oligosacáridos G0 y G2. Como se ha tratado anteriormente, las cantidades de oligosacáridos G0 y G2 del suero de un paciente se pueden medir mediante HPLC o ELISA usando anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G0) y anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G2). Por consiguiente, los "agentes para la determinación de las cantidades de los oligosacáridos G0 y G2 en el suero" pueden incluir cualquier agente usado para el protocolo de medición.

10 Una realización del kit puede incluir (1) un agente para el aislamiento de la IgG en el suero; y (2) un agente para la separación de los oligosacáridos de la IgG. El agente para el aislamiento de la IgG en el suero puede ser cualquier agente usado en los procedimientos conocidos para este fin y puede incluir la columna que contiene proteína A o proteína G. El kit de esta realización puede comprender además un agente para modificar los oligosacáridos separados, tales como 2-aminopiridina y/o una columna de HPLC para el análisis de oligosacáridos.

15 En otra realización, el kit puede ser el adoptado para el método de ELISA y comprende (1) anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G0); (2) anticuerpo anti-IgG (oligosacárido G2); (3) soporte sólido para la inmovilización de IgG (oligosacárido G0) e IgG (oligosacárido G2) del mismo, por ejemplo, microplaca, tubo de plástico o perlas; y (4) una enzima para la detección, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, y el sustrato para la enzima. El kit de la presente invención puede comprender además un diluyente apropiado, agente de lavado y los agentes convencionales.

20 En este estudio, los inventores han divulgado que la expresión de ARNm de β -1,4-galactosiltransferasa 1 (β 4GalT 1) se aumenta en pacientes con colitis ulcerosa y se observa una actividad de β 4GalT 1 significativamente superior en pacientes con colitis ulcerosa que la observada en los pacientes con enfermedad de Crohn o en los controles sanos (Ejemplo 6). Por consiguiente, la presente solicitud engloba el método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende la medición de la actividad de β -1,4-galactosiltransferasa en un paciente con enfermedad intestinal inflamatoria o un paciente sospechoso de padecer la enfermedad inflamatoria intestinal, y la diferenciación de la enfermedad inflamatoria intestinal basándose en el resultado de la medición.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Las muestras de suero se recogieron de sangre periférica de las personas que se muestran en la Tabla 1 de la manera convencional: 27 pacientes con enfermedad de Crohn (EC), 27 pacientes con colitis ulcerosa (CU) y 10 controles sanos (CS). Ningún paciente padecía artritis reumatoide.

40

Tabla 1

ANTECEDENTES DE LOS PACIENTES			
	EC	CU	CS
Número (varones/mujeres)	27 (22/5)	27 (16/11)	10 (6/4)
Edad	39 \pm 16	40 \pm 16	37 \pm 12
PRC	2,1 \pm 4	1,7 \pm 4	-

45 Se purificó la IgG sérica usando el kit de purificación de IgG ImmunoPure (Takara Bio Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se puso la fracción de IgG obtenida en una cantidad de aproximadamente 2 nmol en un tubo de microcentrifugación y se liofilizó. Se añadieron 40 μ l de NH_4HCO_3 (pH 8,6) y 20 μ l de agua al tubo y se disolvió el contenido. Se añadieron 20 μ l de glucopeptidasa F (Takara Bio Inc.) (10 mU) al tubo y se incubó este durante una noche a 37 °C. Se añadieron al tubo 50 μ l de acetato de amonio 100 mM (pH 4,0) y se volvió a incubar durante una hora a 37 °C, de modo que se eliminó el amoníaco de la glucosilamina y se separaron los oligosacáridos.

50 A continuación, se sometió la solución obtenida a piridilaminación (PA) usando PALTSTATION® (Takara Bio Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

55 Se cargó aproximadamente 1/10 (aproximadamente 200 pmol) del oligosacárido PA en una columna de sílice ODS para el análisis de los oligosacáridos PALPAK de Tipo R (Takara Bio Inc.) equilibrada con un disolvente que contenía 80 % de disolvente A y 20 % de disolvente B. Los oligosacáridos se separaron con un gradiente del 20 % al 50 % de solvente B durante 50 minutos. Los oligosacáridos PA se detectaron usando un detector de fluorescencia (Ex. 320 nm, Em. 400 nm).

60 Columna: PALPAK de tipo R (4,6 mm ϕ x 250 mm) Takara Bio Inc.
Disolvente A: ácido acético 10 mM-trimetilamina (pH 3,8)

Disolvente B: disolvente A suplementado con 1-butanol al 0,5 %
 Caudal: 1,0 ml/min
 Temperatura de la columna: 40 °C
 Detector de fluorescencia: Ex. 320 nm, Em. 400 nm.

5 Los perfiles de HPLC representativos obtenidos a partir de un control sano, un paciente con enfermedad de Crohn y un paciente con colitis ulcerosa se muestran en las Figuras 5-7, respectivamente. La proporción de G0/G2 fue la proporción de altura de los picos correspondiente al oligosacárido G0 representado por la fórmula anterior (I) o E en la Figura 2 con respecto a la correspondiente al oligosacárido G2 representado por la fórmula anterior (II) o H en la Figura 2. Los antecedentes de los pacientes fueron los siguientes:

Figura 5:

Control sano, varón, edad 58: G0/G2 = 0,57.

Figura 6:

Paciente con enfermedad de Crohn, varón, edad 17, enfermedad de Crohn de tipo colon: G0/G2 = 7,93.

Figura 7:

Paciente con colitis ulcerosa, varón, edad 17, pancolitis: G0/G2 = 1,21.

Además, en la Figura 8, se muestra la distribución de G0/G2 de todos los casos. Los perfiles de HPLC se dividieron entre el grupo de enfermedad de Crohn, y el grupo de colitis ulcerosa y los controles sanos. En todos los pacientes con enfermedad de Crohn, el pico correspondiente al oligosacárido G0 fue superior al del oligosacárido G2. Dado que la proporción de G0/G2 igual o superior a 2,1 fue positiva, todos los controles sanos fueron negativos y el 81 % de los pacientes con enfermedad de Crohn y el 21 % de los pacientes con colitis ulcerosa fueron positivos. Dado que la proporción de G0/G2 igual o superior a 1,5 fue positiva, todos los pacientes con enfermedad de Crohn fueron positivos y el 37 % de los pacientes con colitis ulcerosa y el 20 % de los voluntarios sanos fueron positivos. En la Tabla 2, se muestra la correlación entre el número de personas positivas/negativas de cada grupo y el valor de corte dado (1,5, 2,0 y 2,1).

[Tabla 2]

Correlación entre el valor de corte de G0/G2 y la proporción positiva:

Valor de corte	EC	CU	CS
≥ 2,1	22/27 (81%)	3/27 (11 %)	0/10 (0 %)
≥ 2,0	23/27 (85 %)	4/27 (15 %)	1/10 (10 %)
≥ 1,5	27/27 (100 %)	10/27 (37 %)	2/10 (20 %)

Ejemplo 2

40 Se realizó un ensayo similar al del Ejemplo 1 usando el suero obtenido de 45 pacientes con enfermedad de Crohn (EC), 42 pacientes con colitis ulcerosa (CU) y 25 controles sanos (CS). En la Tabla 3, se presentan las características detalladas de los pacientes.

[Tabla 3]

Características de los pacientes			
	EC n = 45	CU n = 42	CS n = 25
Varón/Mujer	35/10	26/16	15/10
Edad, años, media (DE)	38,8 (15,4)	40,0 (15,4)	37,6 (11,7)
Fumadores n (%)	15 (33)	7 (17)	6 (24)
Edad en el momento del diagnóstico, años, media (DE)	28,9 (13,7)	35,0 (15,2)	
Operación de intestino (incluyendo la apendectomía), n (%)	30 (67)*	2 (5)	
Manifestaciones extraintestinales, n (%)	4 (9)	2 (5)	

Características de los pacientes

Tratamiento:		
Salazosulfapiridina o mesalazina, n (%)	38 (84)	35 (83)
Esteroides, n (%)	4 (9)	19 (45)*
6-MP/AZA, n (%)	4 (9)	1 (2)
Infiximab, n (%)	4 (9)	0 (0)
Antibióticos, n (%)	5 (11)	2 (5)
Nutrición parental total o dieta elemental, n (%)	29 (64)*	4 (10)
Sin tratamiento, n (%)	1 (2)	2 (5)
Localización de la enfermedad (n)		
Intestino delgado/colon/ambos/desconocida	9/8/28	24/10/8
Extendida/colon izquierdo/recto y sigmoide		
Comportamientos patológicos (n):		
Inflamatorio/estructurante/penetrante/desconocido	13/20/12	1,7 (3,5)
PRC (mg/dl), media (DE)	197 (102)	
IAEC, media (DE)		5,7 (5,7)
IAC, media (DE)		
*p < 0,001		

5 Se purificó la IgG sérica usando una columna de Proteína G (Amersham Biotech, Bucks, RU). En detalle, se cargó suero medio diluido con solución salina tamponada con fosfato (PBS) en la columna de proteína G. Posteriormente, se lavó la columna con un mínimo de 10 volúmenes de columna de PBS, seguidos del mismo volumen de bicarbonato de amonio 10 mM. Se eluyó la IgG unida a la columna usando ácido trifluoroacético al 0,1 % (pH 2,2). Se midió la concentración de IgG usando espectroscopía ND-1000 de Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) a 280 nm.

10 Se secó la muestra de IgG purificada (10-20 nmol) con el sistema SpeedVac (Labconco Corporation, Kansas City, MO) y después se disolvió en 20 µl de bicarbonato de amonio 100 mM. Se separaron los oligosacáridos ligados a N de las muestras de IgG purificada por incubación durante una noche con 0,5 mU de glucopeptidasa F (Takara Bio Inc.) a 37 °C. Se volvieron a incubar los oligosacáridos con acetato de amonio 50 mM (pH 4,0) durante 30 minutos y se liofilizaron.

15 Se marcaron los oligosacáridos separados con 2-aminopiridina mediante GlycoTag (Takara Bio Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eliminó el exceso de 2-aminopiridina con un kit de preparación de glucano de cartucho de celulosa (Takara Bio Inc.) y luego se incubaron los oligosacáridos con ácido acético 2 M a 80 °C durante 2 horas para eliminar los ácidos siálicos.

20 Se analizaron los oligosacáridos piridilaminados (PA) de IgG en el sistema de HPLC de fase inversa (Waters Corp., Milford, MA).

25	Columna:	PALPAK de tipo R (2 mm φ x 150 mm) Takara Bio Inc.
	Disolvente A:	Tampón de fosfatasa de sodio 10 mM (pH 4,4)
	Disolvente B:	Tampón de fosfatasa de sodio suplementado con 1-butanol al 0,5 %
	Caudal:	0,5 ml/min
	Temperatura de la columna:	40 °C

30 Los glucanos se separaron con un gradiente del 0 % al 50 % de solvente B durante 30 minutos seguido de 10 minutos de disolvente B al 50 %. Los oligosacáridos PA se detectaron usando un detector de fluorescencia (Waters 2475) (Ex 320 nm, Em 400 nm).

35 Las G0/G2 de los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa fueron mayores que la de los voluntarios sanos. Enfermedad de Crohn (media ± DE): 2,33 ± 1,58, colitis ulcerosa: 1,24 ± 0,78, y voluntarios sanos: 0,69 ± 0,34. Véase la Figura 9, (EC frente a CS: p < 0,01, y CU frente a CS: p < 0,001). Además, la G0/G2 de los pacientes con enfermedad de Crohn fue significativamente mayor que la de la colitis ulcerosa (p < 0,01, Figura 9).

Ejemplo 3

40 Los inventores investigaron si la G0/G2 se correlaciona con parámetros clínicos. Se determinaron las actividades clínicas usando el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (IAEC) para la enfermedad de Crohn o el índice de actividad clínica (IAC) para la colitis ulcerosa. En la enfermedad de Crohn, la G0/G2 de los pacientes activos (IAEC ≥

150) fue significativamente superior a la de los pacientes en remisión (IAEC < 150, p < 0,01, Figura 10A). La G0/G2 también fue significativamente mayor en los pacientes con enfermedad de Crohn extendida, donde la inflamación no se limitaba al íleon terminal (Categoría L2 y L3 de la Clasificación de Viena) que en los pacientes con inflamación solo en el íleon terminal (Categoría L1, p < 0,05, Figura 10B). Del mismo modo, G0/G2 fue significativamente mayor en los pacientes con colitis ulcerosa activa (IAC ≥ 6) que en los pacientes en remisión (IAC < 6, p < 0,01, Figura 10C). La G0/G2 fue significativamente mayor en los pacientes con colitis ulcerosa extendida (colitis total) que en aquellos que solo tenían afectado el colon del lado izquierdo (P < 0,05, Figura 10D). Los inventores no encontraron ninguna correlación entre G0/G2 y el nivel de PRC, la edad de inicio o la duración de la enfermedad (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Los inventores investigaron la eficacia de IgG agalactosilada como marcador serológico para la enfermedad inflamatoria intestinal. La condición en la que G0/G2 resultó ser igual o superior a 1,4, que era la media + 2DE de G0/G2 en los controles sanos, se definió como positiva en la determinación del positivo o negativo en IgG agalactosilada (aGAL (+)/ (-)). Las tasas positivas en la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y los controles sanos fueron del 72 %, 33 % y 0 %, respectivamente. La diferencia entre cada grupo fue significativa (p < 0,01, Figura 11A).

Los inventores determinaron entonces el nivel de anticuerpos contra *Saccharomyces cerevisiae* (ACSC) que se conoce como el marcador más adecuado para la detección de la enfermedad de Crohn, y se comparó con G0/G2. Las concentraciones de ACSC en suero se examinaron usando el kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para IgG ACSC (Génesis Diagnostics, Cambridge, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores superiores a 10 U/ml se definieron como positivos. Se compararon la sensibilidad y la especificidad de G0/G2 con ACSC para la diferenciación de la EII mediante la curva característica del funcionamiento del receptor (ROC) y el área bajo la curva (ABC). Tanto la sensibilidad como la especificidad de G0/G2 fueron superiores a ACSC para la diferenciación de la enfermedad de Crohn y los controles sanos (ABC de G0/G2 frente a ACSC = 0,926 [intervalo de confianza del 95 % (IC), de 0,872 a 0,980] frente a 0,815 [IC del 95 %, 0,732 a 0,897]; Figura 11B). Por otra parte, tanto la sensibilidad como la especificidad de G0/G2 fueron más altas que los de ACSC para la diferenciación de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (ABC de G0/G2 frente a ACSC = 0,849 [IC del 95 %, 0,780 a 0,918] frente a 0,792 [IC del 95 %, de 0,714 a 0,869]; Figura 11C). No hubo correlación entre los niveles de G0/G2 y ACSC en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Figura 11D y 11E).

Ejemplo 5

El solicitante investigó luego la correlación entre IgG agalactosilada (determinada en base a G0/G2) y el pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal. En este ejemplo, "libre de recaída clínica" se definió como la condición en la que los pacientes mantienen la remisión durante más de 1 año tomando bien salazosulfapiridina o ácido 5-aminosalicílico (sin corticosteroide, anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral (TNF) α ni inmunomoduladores). Se determinó si la IgG agalactosilada era positiva o negativa (aGAL (+)/(-)) de la misma manera que en el Ejemplo 4. La tasa libre de recaída clínica de los pacientes con colitis ulcerosa aGAL (+) (11 %) fue significativamente inferior a la de los pacientes con colitis ulcerosa aGAL (-) (77 %, p < 0,001, Tabla 4). La tasa libre de recaída clínica de los pacientes con enfermedad de Crohn aGAL (+) fue inferior a la de los pacientes aGAL(-) (Tabla 4). Por otra parte, en pacientes con colitis ulcerosa cuyos niveles de PRC fueron negativos en el momento de la toma de muestras de sangre, la tasa libre de recaída clínica de los pacientes con colitis ulcerosa AGAL (+) (0 % (0/5)) fue significativamente inferior a la de los pacientes con colitis ulcerosa AGAL (-) (90 % (19/21), p < 0,001). Estos resultados indican la eficacia de G0/G2 como marcador para el pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal.

[Tabla 4]

Correlación entre aGAL(+)/(-) y la tasa libre de recaída clínica en pacientes con EC y CU			
	aGAL(-)	aGAL(+)	Valor de p
EC	50 % (2/4)	6 % (1/17)	p = 0,08
Todas las CU	77 % (20/26)	11 % (1/9)	p < 0,001

Ejemplo de referencia 1

Se investigó el perfil de los oligosacáridos de IgG en un paciente tanto con colitis ulcerosa como con artritis reumatoide (AR) de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. Paciente con colitis ulcerosa, mujer, 69 años, PRC 5,43, afectación del colon del lado izquierdo asociada con AR. El perfil de oligosacáridos de IgG de HPLC se muestra en la Figura 12. El perfil de oligosacáridos de IgG de esta paciente fue similar al de los pacientes con enfermedad de Crohn. La G0/G2 fue de 2,70.

Ejemplo 6

La actividad de β -galactosidasa es responsable de la liberación de la galactosa terminal de los oligosacáridos de IgG en sueros de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Se incubaron sueros de pacientes con enfermedad de Crohn y de controles sanos con oligosacáridos biantenarios piridilaminados con una galactosa de brazo exterior (cadena de azúcar PA 001, Takara Bio, Inc.) durante 3 días a 37 °C y se sometieron estos oligosacáridos a análisis por HPLC. La galactosa terminal no se agotó en los sueros de los pacientes con enfermedad de Crohn ni en los controles sanos, lo que sugiere que no hubo un aumento de las actividades de la β -galactosidasa en el suero de ninguno de paciente con enfermedad de Crohn ni en los controles sanos (datos no mostrados).

A continuación, los inventores examinaron la actividad de la enzima beta-galactosiltransferasa de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Dado que las IgG son generadas por las células plasmáticas y los linfocitos B, la expresión del ARNm de beta-galactosiltransferasa (β 4GalT) I en esas células se determinó por medio del procedimiento de PCR en tiempo real. Además, se examinó la actividad enzimática de β 4GalT I en células plasmáticas.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la sangre venosa de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal o controles sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Se separaron los linfocitos B y las células plasmáticas de las CMSP con un kit de aislamiento de linfocitos B II y un kit de aislamiento de células plasmáticas, respectivamente (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se aisló el ARN celular total usando Isogen-LS (Wako Chemicals, Osaka, Japón), y se sintetizaron ADN complementarios a partir del ARN usando el sistema de primeras cadenas Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real usando TaqMan, la mezcla de reacción se preparó mediante la mezcla madre para PCR Universal TaqMan con un juego de cebador y sonda de PCR TaqMan previamente diseñado y marcado para la β -1,4-galactosiltransferasa (β 4GalT) I humana o el control endógeno de beta-actina humana (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La PCR en tiempo real se realizó usando un instrumento y programa informático de sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems).

Se disolvieron las células plasmáticas aisladas en 100 μ l de tampón TNE (Tris-HCl 25 mM (pH 7,8), NP-40 al 1 %, EDTA 1 mM), se sometieron a ultrasonidos, se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°, y se recogió el sobrenadante. Se mezclaron 7,5 μ l de sobrenadante celular con 6,25 μ l de UDP-galactosa 80 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y 5 μ l de oligosacáridos ligados a *N* agalactosilados PA 0,77 mM, y se incubó la mezcla y se ajustó hasta 25 μ l con tampón HEPES de modo que la concentración final de la molécula aceptora en la mezcla de reacción fue de 77 μ M. Se incubó la mezcla a 37 °C durante 24 horas y se terminó la reacción por ebullición durante 1 minuto. Se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 10 minutos y se analizaron 5 μ l de 25 μ l de sobrenadantes por HPLC como se ha descrito anteriormente. La actividad de β 4GalT se calculó de la siguiente manera: se midió el área bajo el pico de los oligosacáridos galactosilados tras la reacción y se determinó la concentración usando un oligosacárido PA galactosil bi-antenario convencional. La actividad de β 4GalT se expresó como nmoles/hora dividiendo la concentración de los oligosacáridos galactosil entre el tiempo de incubación.

En las células plasmáticas preparadas a partir de pacientes con colitis ulcerosa, la expresión del ARNm de β 4GalT fue significativamente mayor que en los pacientes con enfermedad de Crohn ($P < 0,05$) o voluntarios sanos ($P < 0,01$, Figura 13A). La expresión del ARNm de β 4GalT en los linfocitos B de pacientes con colitis ulcerosa también fue significativamente superior a la de los pacientes con la enfermedad de Crohn o voluntarios sanos ($P < 0,05$, Figura 13B). Por otra parte, la actividad de β 4GalT en las células plasmáticas de pacientes con colitis ulcerosa fue superior a la de los pacientes con enfermedad de Crohn o voluntarios sanos (Figura 13C).

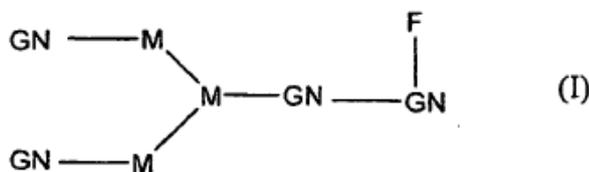
Ejemplo de referencia 2

Se examinó el anticuerpo anti-IgG agalactosil en suero, que se había usado como marcador del diagnóstico de la AR, en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Solo 1 de los 41 pacientes con enfermedad de Crohn (2,0 %) y 2 de los 38 pacientes con colitis ulcerosa (5 %) fueron positivos en el anticuerpo contra IgG agalactosil (Figura 14). En estos 3 pacientes que fueron positivos en el anticuerpo contra IgG agalactosilada, no hubo diferencias en las características de la enfermedad ni complicaciones extraintestinales en comparación con los pacientes negativos en el anticuerpo contra IgG agalactosilada. Este resultado sugiere que el nivel de anticuerpos contra IgG agalactosilada no es adecuado para el diagnóstico de diferenciación de la enfermedad inflamatoria intestinal, específicamente, el diagnóstico de diferenciación entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal.

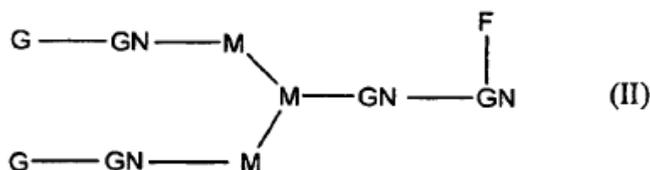
REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal que comprende: determinar la proporción relativa del oligosacárido G0 mostrado mediante la fórmula (I):

5



con respecto al oligosacárido G2 mostrado mediante la fórmula (II):



10 donde G representa galactosa, M representa manosa, GN representa *N*-acetilglucosamina y F representa fucosa en la fracción de oligosacáridos de IgG en suero obtenida de un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal o un paciente sospechoso de padecer la enfermedad inflamatoria intestinal, y diferenciar la enfermedad inflamatoria intestinal basándose en la proporción obtenida.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde al paciente se le diagnostica la enfermedad de Crohn cuando la proporción del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2 ($G0/G2$) es superior a un valor predeterminado basándose en las proporciones de $G0/G2$ determinadas en los sueros de pacientes que tienen la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa y en individuos sanos.

20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde al paciente se le diagnostica colitis ulcerosa cuando la proporción del oligosacárido G0 con respecto al oligosacárido G2 ($G0/G2$) es inferior a un valor predeterminado basándose en las proporciones de $G0/G2$ determinadas en los sueros de pacientes que tienen la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa y en individuos sanos.

25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la $G0/G2$ superior significa la mayor gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal en el paciente.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la $G0/G2$ inferior significa el mejor pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal en el paciente.

30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende las etapas de:

- 1) aislar inmunoglobulina G del suero de un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal;
- 2) separar oligosacáridos de la inmunoglobulina G;
- 3) medir la proporción relativa entre el oligosacárido G2 y el oligosacárido G0; y
- 4) diferenciar la enfermedad inflamatoria intestinal basándose en la proporción obtenida.

35

7. Un kit para llevar a cabo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende:

- 1) anticuerpo contra la inmunoglobulina G (oligosacárido G0);
- 2) anticuerpo contra la inmunoglobulina G (oligosacárido G2);
- 3) soporte sólido para inmovilizar el anticuerpo contra la inmunoglobulina G (oligosacárido G0) y el anticuerpo contra la inmunoglobulina G (oligosacárido G2) en el mismo; y
- 4) enzima para la detección y el sustrato para la enzima.

40

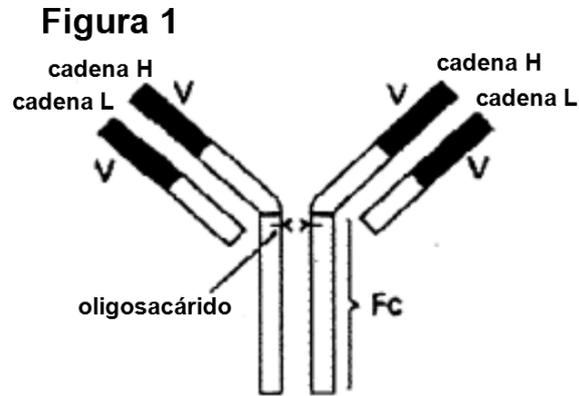


Figura 2

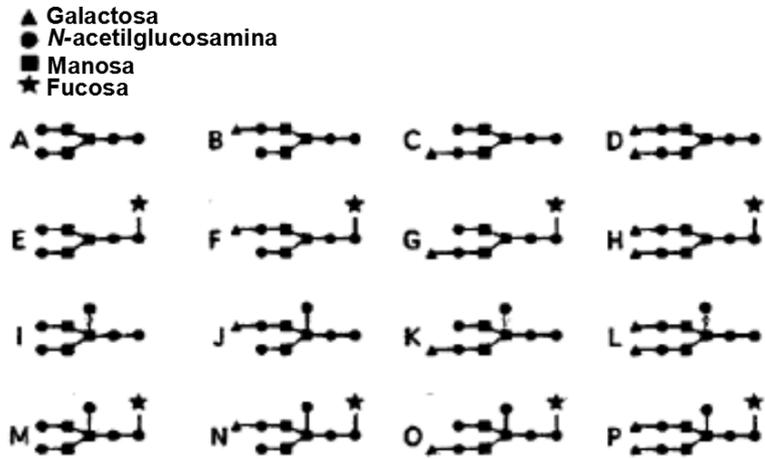


Figura 3

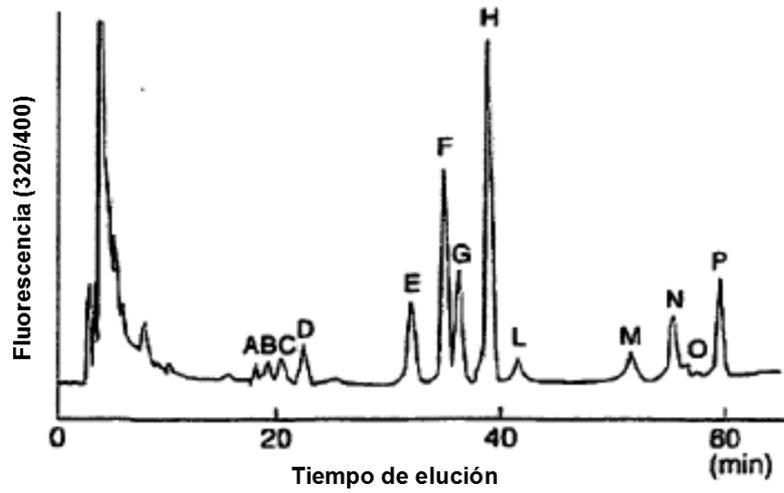


Figura 4

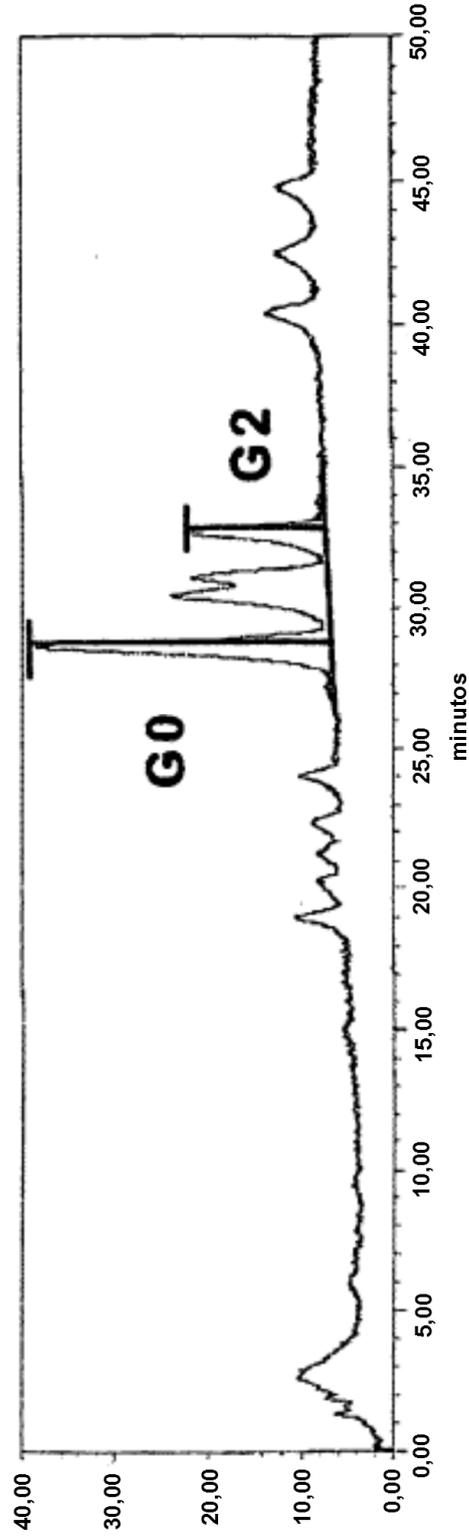


Figura 5

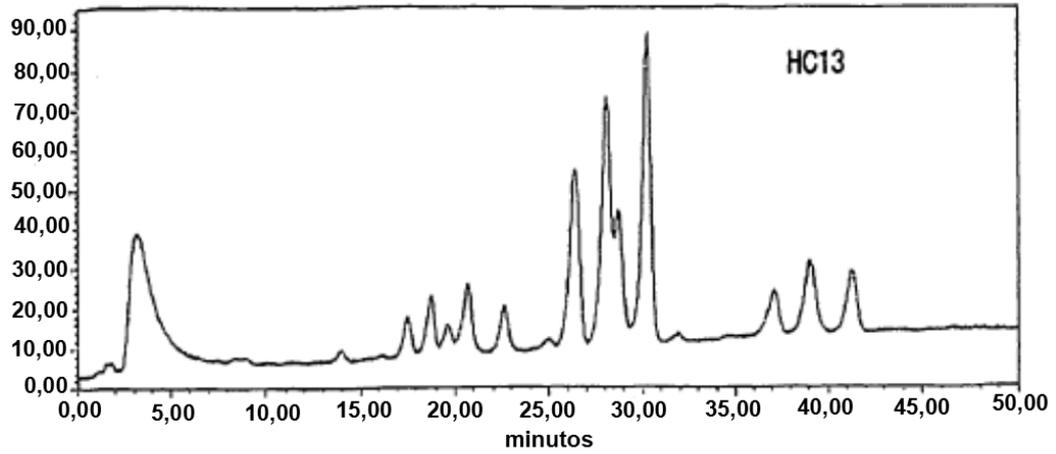


Figura 6

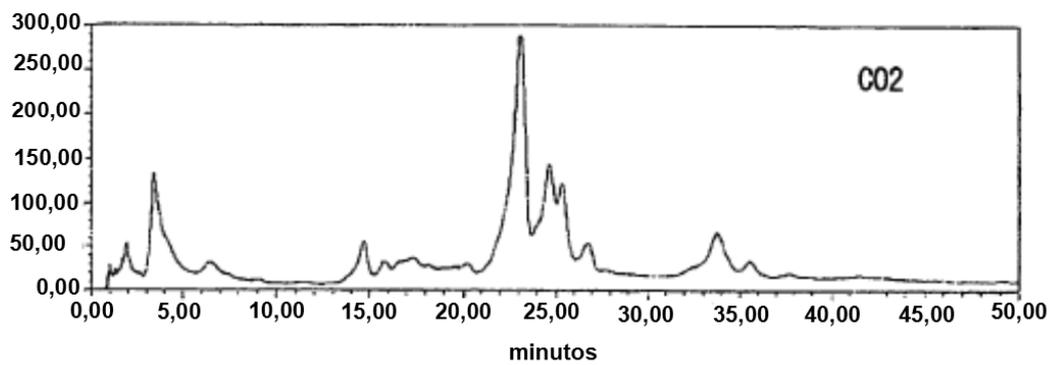


Figura 7

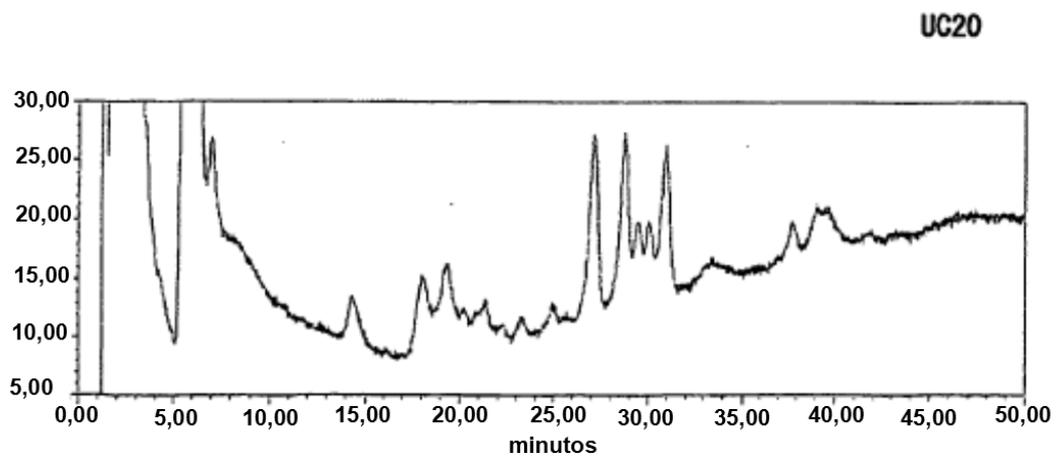


Figura 8

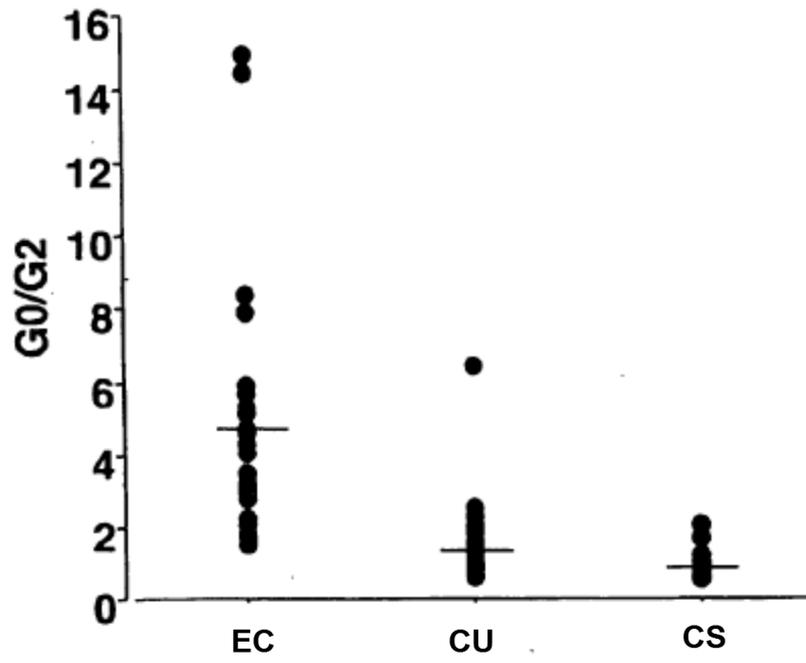


Figura 9

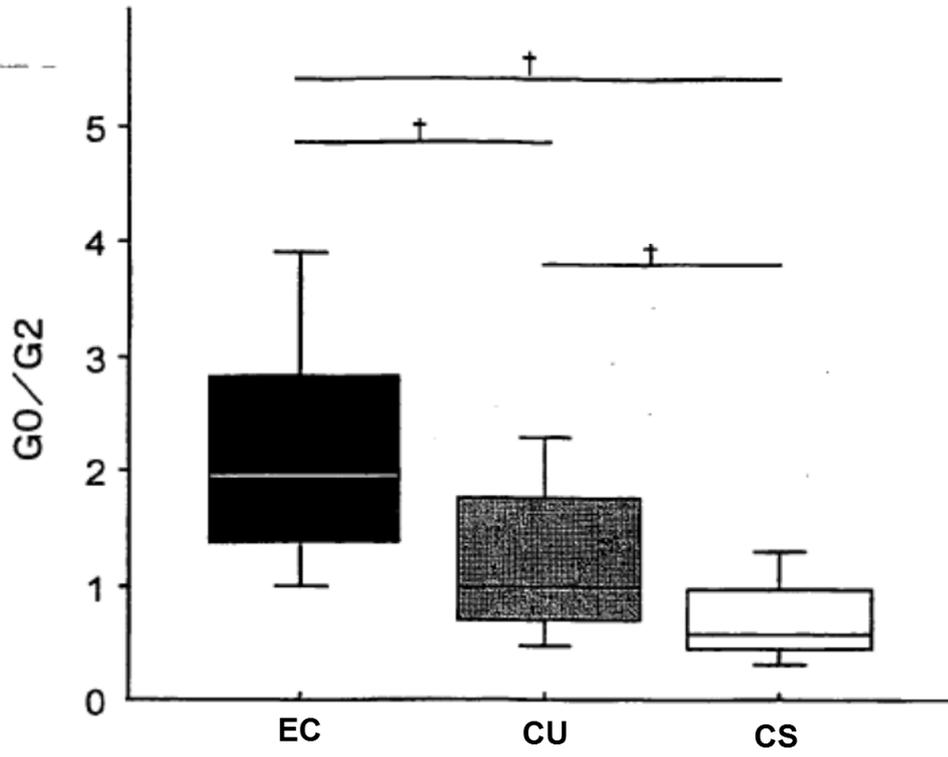


Figura 10

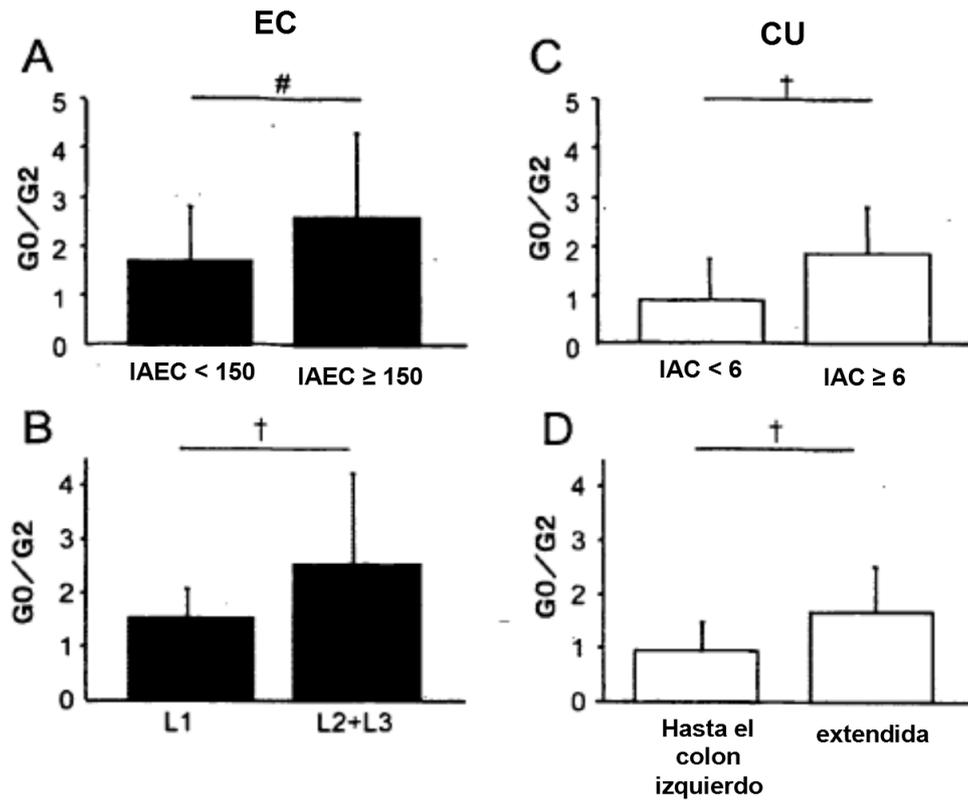


Figura 11A

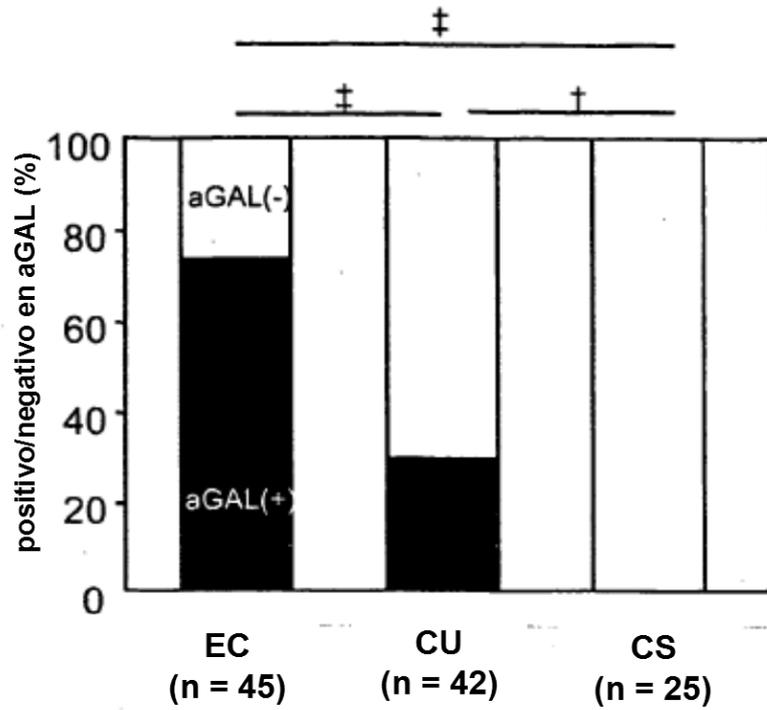


Figura 11B

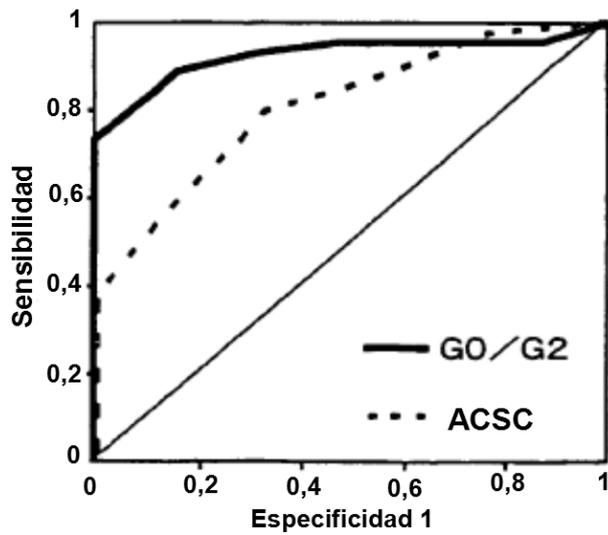


Figura 11C

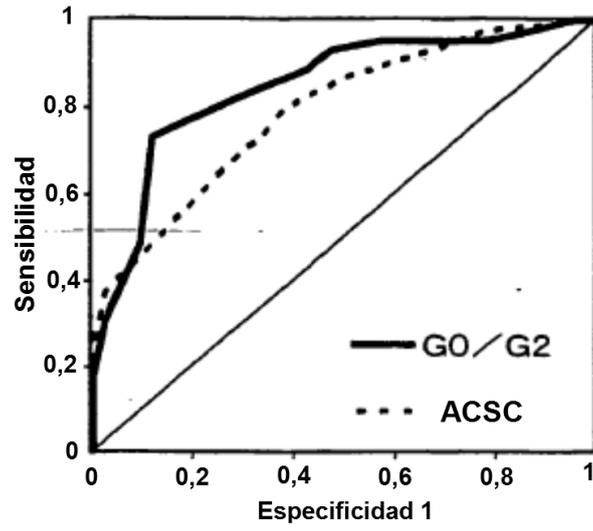


Figura 11D

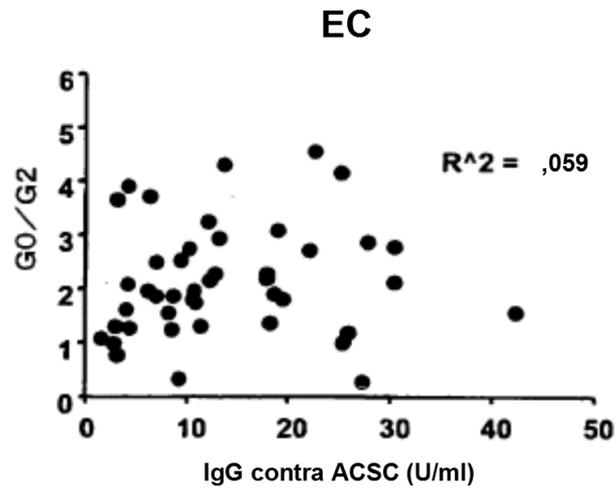


Figura 11E

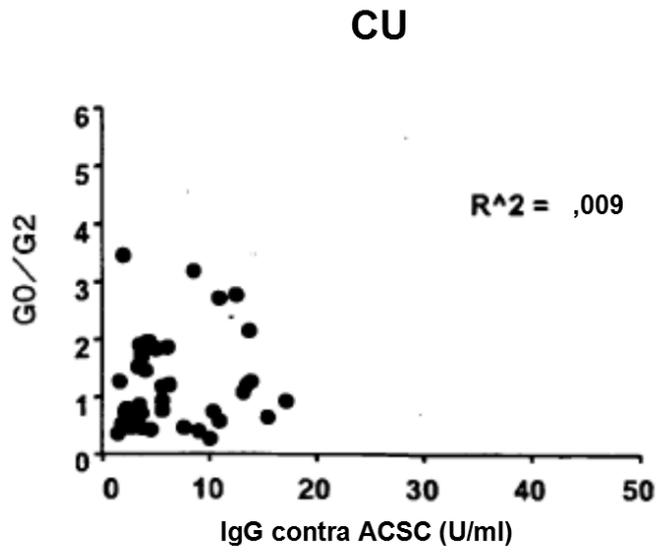


Figura 12

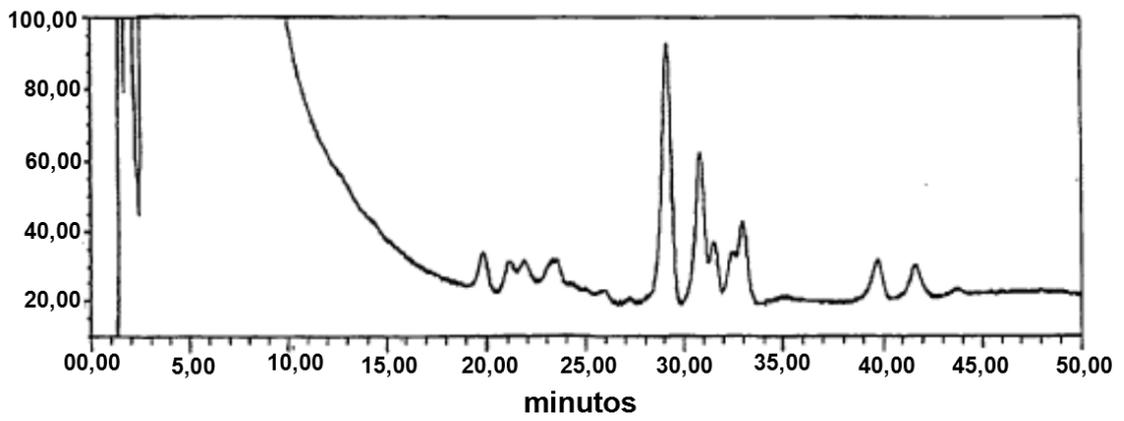


Figura 13A

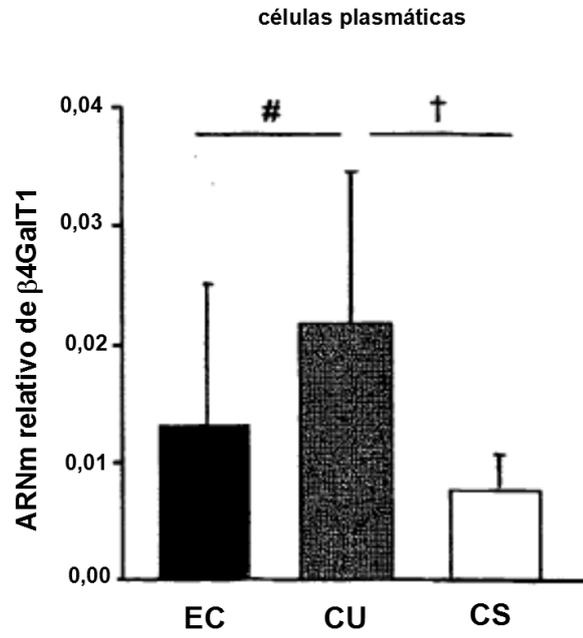


Figura 13B

