

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 598**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61P 13/10** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2013 PCT/US2013/055626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14042828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2013 E 13837424 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2895856**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la motilidad del intestino y la vejiga, y de la fibromialgia**

30 Prioridad:

**17.09.2012 US 201261701923 P**

**08.02.2013 US 201361762632 P**

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

**14.12.2017**

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)  
8700 Beverly Boulevard  
Los Angeles, CA 90048, US**

72 Inventor/es:

**PIMENTEL, MARK y  
CHANG, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 646 598 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

Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la motilidad del intestino y la vejiga, y de la fibromialgia

## 5 Antecedentes

El síndrome del intestino irritable (IBS) es el trastorno gastrointestinal más frecuente. Aunque la patogénesis históricamente se enfocó en la hiperalgesia visceral (1), un trabajo reciente enfatiza en que la fisiopatología del IBS se debe a aberraciones en la flora del intestino. Estas hipótesis emergieron de dos áreas de investigación diferentes. La primera hipótesis de la flora intestinal postula que, el sobrecrecimiento de las bacterias del intestino (SIBO) puede contribuir al IBS y sus síntomas. En un artículo reciente (2), los postulados de Koch sugieren que la evidencia sustenta este concepto. Esto se sustenta, además, por el éxito de un estudio fase III reciente, que evaluó el uso de antibióticos en el tratamiento del IBS (3) y en estudios de cultivo del intestino delgado proximal (estudios de Posserud y Pylaris). La otra hipótesis de la flora intestinal se fundamenta en el desarrollo del IBS después de un episodio agudo de gastroenteritis. Ahora existen dos metaanálisis, cualquiera de los cuales revela hallazgos similares acerca de que, aproximadamente el 10 % de los sujetos que presentan gastroenteritis aguda desarrollarán IBS a largo plazo (4, 5).

Diversos métodos de tratamiento de la técnica previa se enfocan en el alivio de los síntomas. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos adicionales para el diagnóstico y el tratamiento del IBS, específicamente para tratar la causa del IBS, así como también para tratar los trastornos de la motilidad del intestino y de la vejiga.

## Resumen de la invención

Las siguientes modalidades y aspectos de esta se describen y se ilustran junto con las composiciones y los métodos que se destinan a ser representativos e ilustrativos, pero no limitativos en el alcance.

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un método, que comprende: proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia; que detecte en la muestra biológica, una presencia o un nivel de un anticuerpo anti-vinculina; y que determine una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta la presencia de un anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es mayor que el nivel de un control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es significativamente mayor que el nivel de un control establecido, o que determine una ausencia o probable ausencia de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta una ausencia de un anticuerpo anti-vinculina, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es igual o más bajo que el nivel de un control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina no es significativamente más alto que el nivel de un control establecido.

En diversas modalidades, los métodos pueden comprender, además, seleccionar una terapia para los trastornos de la motilidad gastrointestinal, trastornos de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia si se determina la presencia o probable presencia de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia.

En diversas modalidades, la terapia puede ser un curso de terapia con antibiótico. En diversas modalidades, la terapia puede comprender un agente neutralizante de los anticuerpos anti-vinculina o un agente que inhibe los anticuerpos anti-vinculina. En diversas modalidades, la terapia puede comprender un agente para cambiar la vinculina de un estado inactivo a un estado activo. En diversas modalidades, la terapia puede comprender un agonista de vinculina. En diversas modalidades, el agonista de vinculina puede ser un péptido activador de vinculina. En diversas modalidades, la terapia puede comprender un activador de vinculina. En diversas modalidades, el activador de vinculina puede ser talina, f-actina, a-catenina o una combinación de estos.

En diversas modalidades, el método puede comprender, además, la administración de la terapia.

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un sistema, que comprende: una muestra biológica aislada de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia; y un ensayo para detectar en la muestra biológica, una presencia de un anticuerpo anti-vinculina.

En diversas modalidades, el ensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), en donde el ELISA comprende el uso de vinculina, sec. con núm. de ident.:1 o un fragmento de esta como un sustrato o reactivo para unirse al anticuerpo anti-vinculina.

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un método, que comprende: proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere un diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia; que detecte en la misma muestra biológica, una presencia o un nivel de un anticuerpo anti-vinculina; y que determine una presencia o probable presencia del síndrome del intestino irritable (IBS) si se detecta la presencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es más alto que el nivel de un control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es significativamente más alto que el nivel de un control

establecido, o que determine una presencia o probable presencia de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) si se detecta una ausencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es igual o más bajo que el nivel de un control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina no es significativamente más alto que el nivel de un control establecido.

5

En diversas modalidades, el método puede comprender, además, seleccionar una terapia para el IBS si se diagnostica el IBS, o seleccionar una terapia para la IBD si se diagnostica la IBD. En diversas modalidades la terapia del IBS puede ser un curso de una terapia con antibióticos. En diversas modalidades la terapia del IBS puede comprender un agente neutralizante de los anticuerpos anti-vinculina, o un agente inhibidor de los anticuerpos anti-vinculina. En diversas modalidades la terapia del IBS puede comprender un agente para cambiar la vinculina desde el estado inactivo a un estado activo. En diversas modalidades, la terapia del IBS puede comprender un agonista de vinculina. En diversas modalidades, el agonista de vinculina puede ser un péptido activador de vinculina. En diversas modalidades, la terapia del IBS puede comprender un activador de vinculina. En diversas modalidades, el activador de vinculina puede ser talina, f-actina, a-catenina o una combinación de estas.

10

15

En diversas modalidades, el método puede comprender, además, administrar la terapia del IBS o la terapia de la IBD.

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un sistema que comprende: una muestra biológica aislada de un sujeto que requiere un diagnóstico para diferenciar entre el síndrome de intestino irritable (IBS) y la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD); y un ensayo para detectar en la muestra biológica, una presencia de un anticuerpo anti-vinculina.

20

En diversas modalidades, el ensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), en donde el ELISA comprende el uso de vinculina, sec. con núm. de ident.:1 o un fragmento de esta como un sustrato o reactivo para unirse al anticuerpo anti-vinculina.

25

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un método que comprende: proporcionar un agente de terapia seleccionado del grupo que consiste en: un agente neutralizante de anticuerpos anti-vinculina, un agente inhibidor de anticuerpos anti-vinculina, un agente capaz de cambiar la vinculina de un estado inactivo a un estado activo, un agonista de vinculina, un activador de vinculina y combinaciones de estos; y administrar el agente de terapia a un sujeto que requiere el tratamiento de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia.

30

En diversas modalidades, el agonista de vinculina puede ser un péptido activador de vinculina. En diversas modalidades, el activador de vinculina puede ser talina, f-actina, a-catenina o una combinación de estos.

35

#### Breve descripción de las figuras

Las modalidades representativas se ilustran en las figuras enumeradas. Se pretende que las modalidades y figuras descritas en la presente descripción deben considerarse representativas en lugar de restrictivas.

40

La Figura 1 representa la transferencia Western de proteína versus anticuerpo de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 2 representa la transferencia Western de lisados C. versus anticuerpo de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

45

La Figura 3 representa la inmunohistoquímica de muestras de ratas agudas, día 2, de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 4 representa imágenes confocales de muestras de ratas agudas, día 2; preinmune versus *Campylobacter jejuni* de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

50

La Figura 5 representa la inmunohistoquímica de la muestra control de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 6 representa imágenes confocales de la muestra control; suero preinmune versus *Campylobacter jejuni* de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 7 representa la inmunohistoquímica de muestras humanas de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

55

La Figura 8 representa imágenes confocales de la muestra control, de ckit y de la colocalización de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 9 representa imágenes confocales de la muestra control, de s100, y de la colocalización de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

60

La Figura 10 representa imágenes confocales de muestras de humanos, de S100 y de la colocalización de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 11 representa imágenes confocales de muestras de humanos, de PGP 9.5 y de la colocalización de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 12 representa la transferencia Western del fraccionamiento subcelular y del bloqueo de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

65

La Figura 13 representa imágenes confocales de muestras humanas, de vinculina y de la colocalización de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 14 representa una diferencia entre los recuentos de bacterias altos y bajos en el intestino delgado de ratas de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 15 representa una comparación entre los títulos de anticuerpos y los niveles SIBO ( $r=0.3$ ,  $P=0.04$ ) de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

5 La Figura 16 representa los anticuerpos cdtB en suero humano de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 17 representa los sueros cdtB y preinmune frente a la proteína vinculina de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

10 La Figura 18 representa los anticuerpos anti-vinculina en suero humano de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

La Figura 19 representa los títulos de anticuerpos que se midieron en IBS, IBD y controles sanos. Los sujetos con IBS tenían el nivel de anticuerpos más alto de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención. El eje y representa la densidad óptica (OD) de la prueba ELISA.

15 Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton y otros, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3ra ed.*, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5ta ed.*, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ra ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporciona a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos que se usan en la presente solicitud. Para referencias sobre cómo preparar esos anticuerpos, ver D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 1988); Kohler y Milstein, (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511; Queen y otros. Patente de los Estados Unidos núm. 5.585.089; y Riechmann y otros, Nature 332: 323 (1988).

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción, los que podrían usarse en la práctica de la presente invención. Ciertamente, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos.

30 El término "unirse específicamente" como se usa en la presente descripción se refiere al acto de un anticuerpo que se une a su antígeno y se destina a excluir la unión no específica de bajo nivel que puede ocurrir aleatoriamente entre las proteínas. El término "unirse específicamente" como se usa en la presente descripción, no pretende y no implica que el anticuerpo no se unirá a ninguna proteína distinta a las proteínas o polipéptidos como se describen en la presente descripción ya que los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada con cualquier proteína que incluya el epítipo relevante.

35 El término "significativamente más alto" como se usa en la presente descripción, en relación con las cantidades de referencia, se refiere a una cantidad estadísticamente significativa mayor que la cantidad de referencia.

40 Nuestro descubrimiento de la reactividad cruzada de los anticuerpos CdtB con factores endógenos en tejido del íleon de rata no infectada, mediante inmunohistoquímica, condujo al estudio de la susceptibilidad al desarrollo del IBS a través de mimetismo molecular de CdtB como un mecanismo en el desarrollo del sobrecrecimiento bacteriano. En este estudio, investigamos la respuesta inmunitaria asociada con CdtB en sistemas humanos y animales mediante el seguimiento de los anticuerpos que se unen a CdtB durante la infección aguda, y el desarrollo de anticuerpos asociados con CdtB como un predictor del IBS tanto en ratas como en humanos.

45 Después de una gastroenteritis aguda los anticuerpos contra cdtB, a través del mimetismo molecular, producen un autoanticuerpo contra la vinculina en el IBS. La detección de este anticuerpo es predictiva del IBS, con respecto a la IBD y controles sanos. En animales, demostramos que los títulos de anti-cdtB se correlacionan con el grado de sobrecrecimiento bacteriano, y sin desear estar sujetos a ninguna teoría particular, creemos que una neuropatía inducida por estos anticuerpos es una causa de SIBO.

50 Demostramos por primera vez que, el mimetismo molecular a través de la autoinmunidad puede tener un papel importante en la fisiopatología del IBS posinfeccioso, tanto en ratas como en humanos. Los anticuerpos contra la subunidad B de la toxina de distensión citoletal de *C. jejuni* reaccionan de manera cruzada con los elementos del sistema nervioso entérico y específicamente de la ICC y los ganglios mientéricos. Esta interacción parece crear un grado de inflamación celular y quizás, a través de efectos sobre la actividad motora intestinal, el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, ya que los mayores títulos de anticuerpos son predictivos de anomalías mayores en la flora del intestino delgado. Además, la detección de estos anticuerpos en el suero de humanos y ratas tiene un valor diagnóstico importante.

55 Se ha hecho evidente que la gastroenteritis aguda es una causa del síndrome del intestino irritable. A partir de dos metaanálisis recientes, la incidencia del IBS después de un brote de gastroenteritis bacteriana es de aproximadamente del 10 % (estudios de Thabane y Halvorsson). Los dos brotes importantes más estudiados, incluyen el brote de Walkerton en Canadá y el brote en España (Mearin y otros). Con anterioridad a estos estudios, los investigadores

sugieran que el IBS posinfecioso era, o bien una entidad separada, o un pequeño subconjunto de la población total con el IBS. Sin embargo, un modelo reciente que usa datos militares y los datos prospectivos conocidos sobre el IBS posinfecioso, combinados con datos del CDC, sobre la incidencia de gastroenteritis en los EE.UU., ahora sugiere que más del 9 % de toda la población estadounidense tendría IBS a partir de esta causa. Si bien el modelado puede ser difícil, este al menos sugiere que la gastroenteritis aguda podría ser responsable de una gran parte del IBS en la comunidad y puede ser la causa principal.

Se han realizado varias observaciones fisiológicas en sujetos con IBS. Estas incluyen la demostración de hipersensibilidad visceral. Aunque muchos sugieren que la sensibilidad visceral es la base de los criterios de Roma en el IBS, irónicamente, la hinchazón se observa a menudo como el síntoma más molesto en el examen del paciente. En base a este síntoma, hace más de una década, los estudios comenzaron a sugerir que el sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO) puede ser una característica del IBS. Si bien este concepto inicialmente fue controvertido, dos estudios recientes a gran escala confirmaron un exceso de bacterias coliformes en el intestino delgado del IBS en comparación con controles sanos (Posserud) e incluso en comparación con sujetos con otra enfermedad del intestino anterior (Pyloris). De hecho, en sujetos que padecen IBS con diarrea predominante, el 60 % de los sujetos tenían SIBO comprobado por cultivo (Pyloris).

Se han creado numerosos modelos animales para estudiar el IBS posinfecioso. Sin embargo, algunos de los modelos publicados más prominentemente usan patógenos que son un patógeno poco común en el IBS y el enfoque de estos modelos es el desarrollo de hiperalgesia visceral. La causa más común de gastroenteritis bacteriana en los EE.UU. es *Campylobacter jejuni* y, por tanto, es probablemente el mayor contribuyente a la incidencia global del IBS posinfecioso en los EE.UU. Mediante el uso de este patógeno, se demostró en un modelo reciente de roedor el desarrollo de la forma intestinal alterada, SIBO, ICC reducido y aumento de linfocitos intrarrectal. Estos hallazgos imitan los hallazgos en humanos con IBS e IBS posinfecioso.

Si bien el *C. jejuni* es una causa común de gastroenteritis y una causa importante del IBS posinfecioso, en el desarrollo del IBS se involucran múltiples patógenos bacterianos. Esto sugiere o bien una respuesta común del hospedero a esta infección, o una toxina común. La toxina de distensión citoletal es común a casi todas las causas de gastroenteritis bacterianas agudas. Esta toxina tiene tres componentes (Cdt A, B y C). Sin embargo, se cree que la toxina activa es Cdt B en base a estudios in vitro del efecto sobre las células HeLa. En el modelo de roedor descrito anteriormente, la infección de ratas con *C. jejuni* 81-176 con una delección de inserción de CdtB no resultó en el fenotipo completo del IBS posinfecioso. Aunque los estudios en humanos sugieren que la intensidad de la gastroenteritis aguda es importante en el desarrollo del IBS, en dos estudios de infección aguda en roedores, la lesión intestinal solo se alteró marginalmente por la presencia o la ausencia de CdtB intacta. Por tanto, Cdt B parece tener otro *papel in vivo* en el desarrollo de IBS.

En la presente descripción demostramos, mediante el uso de un enfoque inmunohistoquímico, que CdtB produce un efecto en el hospedero a través de la producción de autoanticuerpos. Los anticuerpos contra CdtB se unen a las neuronas mientéricas y a las células intersticiales de Cajal. Estos autoanticuerpos son detectables tanto en ratas como en humanos con IBS posinfecioso. De hecho, el anticuerpo tiene un valor diagnóstico significativo tanto para identificar el IBS posinfecioso (incluso en contraste con la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa) y para predecir las consecuencias de una neuropatía del intestino delgado (sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado) en ratas. Estos datos sugieren que el IBS es una enfermedad autoinmune.

Basado en la evidencia actual, parece que el IBS posinfecioso podría ser la causa de la mayoría del IBS en la población de EE.UU. y la evidencia reciente respalda que SIBO es común en el IBS (Posserud y Pyloris) y puede deberse a una alteración neuromuscular del intestino delgado. Sin embargo, este estudio sugiere una secuencia de eventos que conducen a esta alteración que comienza con la exposición a un patógeno bacteriano que contiene CdtB. La respuesta inmunitaria resultante a CdtB produce anticuerpos que reconocen, además, a una proteína citosólica del nervio entérico del hospedero. El autoanticuerpo resultante y su título parecen correlacionarse con el grado de SIBO que podría ser una medida indirecta del deterioro neuronal del intestino delgado. El grado y la presencia de SIBO parecen determinar la alteración intestinal en este modelo (la primera validación del modelo de rata) y en estudios humanos (Blanco 1 y 2).

En conclusión, aunque no deseamos estar sujetos a ninguna teoría en particular, creemos que la gastroenteritis aguda es una causa importante del IBS. En la presente descripción, demostramos que la toxina de distensión citoletal es determinante en el desarrollo del IBS a través de la inducción de un anticuerpo y a través del mimetismo molecular, un anticuerpo que es autoinmune a una proteína del nervio entérico y predictivo de SIBO. Este estudio puede ser un gran avance en la comprensión de la fisiopatología del IBS.

En consecuencia, varias modalidades de la presente invención se basan, al menos en parte, en estos hallazgos.

#### Diagnóstico

Diversas modalidades proporcionan un método y un sistema para diagnosticar un trastorno de la motilidad gastrointestinal, un trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia.

- 5 En diversas modalidades, el método comprende: proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia, que detecte en la muestra biológica, una presencia de anticuerpos anti-vinculina, y que determine una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta la presencia de anticuerpos anti-vinculina, o que determine una ausencia o probable ausencia de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta la ausencia de anticuerpos anti-vinculina. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para la presencia o ausencia de anticuerpos anti-vinculina.
- 10 En diversas modalidades, el método comprende: proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia, que detecte en la muestra biológica, un nivel de anticuerpos anti-vinculina, y que determine una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de un anticuerpo anti-vinculina es más alto que el nivel de un control establecido, o que determine la ausencia o probable ausencia de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de un anticuerpo anti-vinculina es igual o más bajo que el nivel de un control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina dentro de dos desviaciones estándar de los niveles de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sin el trastorno de motilidad gastrointestinal, trastorno de motilidad de vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.
- 20 En diversas modalidades, el método comprende: proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga, o fibromialgia, que detecte en la muestra biológica, un nivel de anticuerpos anti-vinculina, y que determine una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de los anticuerpos anti-vinculina es significativamente más alto que el nivel de un control establecido, o que determine la ausencia o probable ausencia de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de los anticuerpos anti-vinculina no es significativamente más alto que el nivel de un control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina en sujetos sin el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.
- 25 En diversas modalidades, el sistema comprende: una muestra biológica aislada de un sujeto que requiere el diagnóstico del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia, y un ensayo para detectar en la muestra biológica, una presencia o el nivel de un anticuerpo anti-vinculina.
- 30 En diversas modalidades, el ensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que incluye, pero no se limita a, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple y portátil.
- 35 En diversas modalidades, el ensayo comprende un primer reactivo que reacciona con la muestra biológica, un segundo reactivo (por ejemplo, un anticuerpo secundario) para reaccionar con el anticuerpo anti-vinculina y un sustrato. En diversas modalidades, el primer reactivo es vinculina o un fragmento de esta, que reaccionará con el anticuerpo anti-vinculina si está presente en la muestra biológica. En diversas modalidades, el segundo reactivo comprende un marcador para producir una señal que indica la presencia del anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de estos. En diversas modalidades, el marcador es una enzima que reaccionará con el sustrato. En diversas modalidades, el primer reactivo está en una fase sólida (por ejemplo, placa, placa de múltiples pocillos).
- 40 En diversas modalidades, el ensayo comprende un primer reactivo para reaccionar con el anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el primer reactivo comprende un marcador para producir una señal para indicar la presencia del anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de estos. En diversas modalidades, el reactivo está en una fase sólida (por ejemplo, placa, placa de múltiples pocillos).
- 45 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta la presencia de anticuerpos anti-vinculina, o determinar una ausencia o probable ausencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si se detecta la ausencia de anticuerpos anti-vinculina. En diversas modalidades, la máquina es una computadora. En diversas modalidades, la computadora comprende un elemento de visualización para visualizar si hay una presencia o ausencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia.
- 50 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de
- 55
- 60
- 65

5 anticuerpos anti-vinculina es mayor que un nivel del control establecido, o determinar una ausencia o probable ausencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es igual o menor que el nivel del control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina dentro de dos desviaciones estándar de los niveles de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sin el trastorno de motilidad gastrointestinal, trastorno de motilidad de vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

10 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar una presencia o probable presencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es significativamente mayor que un nivel del control establecido, o determinar una ausencia o probable ausencia del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia si el nivel de anticuerpos anti-vinculina no es significativamente más alto que el nivel del control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina en sujetos sin el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

20 En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia detectada por el método o sistema es el síndrome del intestino irritable (IBS), IBS con constipación predominante (C-IBS), IBS con diarrea predominante (D-IBS), IBS alternante (A-IBS) (rebautizado más recientemente como mixto (M-IBS)), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), dispepsia funcional, síndrome de intestino irritable posinfeccioso (PI-IBS), sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), gastroparesia, gastroenteritis alérgica/eosinofílica, constipación, constipación crónica, pseudoobstrucción, cistitis intersticial, síndrome del intestino permeable, o fibromialgia. Sin estar ligados a ninguna teoría en particular, creemos que debido a que la vinculina ayuda a las células a migrar y adherirse entre sí y las células epiteliales tienen vinculina, la vinculina dañada puede permitir que el intestino tenga "fugas". En el caso del sistema nervioso entérico, la vinculina dañada puede afectar la red nerviosa entérica. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es IBS. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es GERD. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es dispepsia funcional.

30 En ciertas modalidades, el sujeto que requiere el diagnóstico del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia de acuerdo con los métodos y sistemas de la presente invención puede tener uno o más síntomas indicativos del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia; por ejemplo, hinchazón, diarrea, constipación, dolor abdominal, fatiga, dolor de fibromialgia.

35 Diversas modalidades de la presente invención proporcionan un método y un sistema de diferenciación entre IBS e IBD.

40 El método puede comprender proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere un diagnóstico para diferenciar entre IBS e IBD, detectar en la muestra biológica, una presencia de anticuerpos anti-vinculina, y hacer un diagnóstico de IBS si se detecta la presencia de anticuerpos anti-vinculina, o hacer un diagnóstico de IBD si se detecta la ausencia de anticuerpos anti-vinculina. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para la presencia o ausencia de anticuerpos anti-vinculina. En ciertas modalidades, el método comprende, además, seleccionar un tratamiento de IBS si se diagnostica IBS, o seleccionar un tratamiento de IBD si se diagnostica IBD.

45 En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere un diagnóstico para diferenciar entre IBS e IBD, detectar en la muestra biológica, un nivel de anticuerpos anti-vinculina, y hacer un diagnóstico de IBS si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es mayor que un nivel del control establecido, o hacer un diagnóstico de IBD si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es igual o menor que el nivel del control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina dentro de dos desviaciones estándar de los niveles de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sanos sin IBS, IBD, o ambos. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

50 En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere un diagnóstico para diferenciar entre IBS e IBD, detectar en la muestra biológica, un nivel de anticuerpos anti-vinculina, y hacer un diagnóstico de IBS si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es significativamente mayor que un nivel del control establecido, o hacer un diagnóstico de IBD si el nivel de anticuerpos anti-vinculina no es significativamente mayor que el nivel del control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sin IBS, IBD o ambos. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

55 En diversas modalidades, el sistema puede comprender una muestra biológica aislada de un sujeto que desee diferenciar entre IBS e IBD, y un ensayo para detectar en la muestra biológica, una presencia de un anticuerpo anti-vinculina o un nivel de anticuerpo anti-vinculina para diferenciar entre el IBS y la IBD.

65

En diversas modalidades, el ensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que incluye, pero no se limita a, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich, ELISA competitivo, ELISA múltiple y portátil.

5 En diversas modalidades, el ensayo comprende un primer reactivo para reaccionar con la muestra biológica si la muestra biológica comprende el anticuerpo anti-vinculina (si los anticuerpos anti-vinculina no están presentes, entonces el primer reactivo no reaccionará con la muestra biológica, pero el primer reactivo aún está presente en el ensayo), un segundo reactivo (por ejemplo, anticuerpo secundario) para reaccionar con el anticuerpo anti-vinculina o un segundo reactivo para reaccionar con el primer reactivo, y un sustrato. En diversas modalidades, el primer reactivo es vinculina o un fragmento de esta. En diversas modalidades, el segundo reactivo comprende un marcador para producir una señal que indica la presencia del anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de estos. En diversas modalidades, el marcador es una enzima que reaccionará con el sustrato. En diversas modalidades, el primer reactivo está en una fase sólida (por ejemplo, placa, placa de múltiples pocillos).

15 En diversas modalidades, el ensayo comprende un primer reactivo para reaccionar con el anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el primer reactivo comprende un marcador para producir una señal para indicar la presencia del anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, el marcador es un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, un punto cuántico, una enzima, peroxidasa de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina (AP), biotina o una combinación de estos. En diversas modalidades, el reactivo está en una fase sólida (por ejemplo, placa, placa de múltiples pocillos).

20 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar la presencia o probable presencia de IBS si se detecta la presencia de anticuerpos anti-vinculina, o determinar la presencia o probable presencia de IBD si se detecta la ausencia de anticuerpos anti-vinculina. En diversas modalidades, la máquina es una computadora. En diversas modalidades, la computadora comprende un elemento de visualización para visualizar si el paciente probablemente tiene IBS o IBD.

25 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar una presencia o probable presencia de IBS si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es mayor que un nivel del control establecido o determinar la presencia o probable presencia de IBD si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es igual o menor que el nivel de control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina dentro de dos desviaciones estándar de los niveles de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sanos sin IBS, IBD, o ambos. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

30 En diversas modalidades, el sistema comprende, además, una máquina para determinar una presencia o probable presencia de IBS si el nivel de anticuerpos anti-vinculina es significativamente mayor que un nivel del control establecido, o determinar una presencia o probable presencia de IBD si el nivel de anticuerpos anti-vinculina no es significativamente más alto que el nivel del control establecido. En diversas modalidades, el nivel del control establecido es un nivel de anticuerpos anti-vinculina de sujetos sanos sin IBS, IBD o ambos. En ciertas modalidades, el método comprende, además, analizar la muestra biológica para un nivel de anticuerpos anti-vinculina.

35 En diversas modalidades, la máquina es una computadora. En diversas modalidades, la computadora comprende un elemento de visualización para visualizar si el paciente probablemente tiene IBS o IBD.

En diversas modalidades, el anticuerpo anti-vinculina detectado en estos métodos o sistemas es un anticuerpo que se une específicamente a vinculina.

40 En diversas modalidades, el anticuerpo anti-vinculina es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de vinculina.

45 En otra modalidad, el anticuerpo anti-vinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de vinculina.

50 En otra modalidad, el anticuerpo anti-vinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de vinculina.

55 En diversas modalidades, el anticuerpo anti-vinculina es un anticuerpo que se une específicamente a la sec. con núm. de ident.:1.

60 En diversas modalidades, el anticuerpo anti-vinculina es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o

## ES 2 646 598 T3

100 % de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de la sec. con núm. de ident.:1.

5 En otra modalidad, el anticuerpo anti-vinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos, que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de la sec. con núm. de ident.:1.

10 En otra modalidad, el anticuerpo anti-vinculina se une específicamente a un polipéptido que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 residuos contiguos de la sec. con núm. de ident.:1.

Los residuos contiguos de la vinculina o de la sec. con núm. de ident.:1 incluyen aquellos que comienzan en cualquier amino ácido y terminan en cualquier amino ácido de la vinculina o de la sec. con núm. de ident.:1.

15 Secuencia de proteína de la Vinculina (sec. con núm. de ident.:1):

MPVFHTRTIESILEPVAQQISHLVIMHEEGEVDGKAIPDLTAPVAAVQAAVSNLVRVG  
KETVQTTEDQILKRDMPPAFIKVENACTKLVQAAQMLQSDPYSPARDYLIDGSRGI  
20 LSGTSDLLTFDEAEVRKIIRVCKGILEYLTVAEVVETMEDLVITYTKNLGPGMTKMA  
KMIDERQQELTHQHRVMLVNSMNTVKELLPVLISAMKIFVTTKNSKNQGIEEALKN  
RNFTVEKMSAEINEIRVLQLTSWDEDAWASKDTEAMKRALASIDSKLNQAKGWL  
25 DPSASPGDAGEQAIRQILDEAGKVGELCAGKERREILGTCKMLGQMTDQVADLRAR  
GQGSSPVAMQKAQVSQGLDVLTAKVENAARKLEAMTNSKQSIKKIDAAQNWLA  
DPNGGPEGEEQIRGALAEARKIAELCDDPKERDDILRSLGEISALTSKLADLRRQGKG  
30 DSPEARALAKQVATALQNLQTKTNRAVANSRPAKAAVHLEGKIEQAQRWIDNPTVD  
DRGVGQAAIRGLVAEGHRLANVMMGPYRQDLLAKCDRVDQLTAQLADLAARGEG  
ESPQARALASQLQDSLKDLKARMQEAMTQEVSDVFSDTTTPIKLLAVAATAPPDAP  
35 NREEVFDERAANFENHSGKLGATAEKAAAVGTANKSTVEGIQASVKTARELTPQVV  
SAARILLRNPNGNAAYEHFETMKNQWIDNVEKMTGLVDEAIDTKSLLDASEEAIKK  
DLDKCKVAMANIQPQMLVAGATSIARRANRILLVAKREVENSEDPKFREAVKAASD  
ELSKTISPMVMDAKAVAGNISDPGLQKSFLDSGYRILGAVAKVREAFQPQEPDFPPPP  
40 PDLEQLRLTDELAPPKPLPEGEVPPRPPPEEKDEEFPEQKAGEVINQPMMAARQ  
LHDEARKWSSKGNIIAAAKRMALLMAEMSRLVRGGSGTKRALIQCAKDIKASDE  
VTRLAKEVAKQCTDKRIRTNLLQVCERIPITSTQLKILSTVKATMLGRTNISDEESEQA  
45 TEMLVHNAQNLMQSVKETVREAEASIKIRTDAGFTLRWVRKTPWYQ

50 En diversas modalidades, detectar la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra biológica que se obtiene del sujeto. En otra modalidad, la detección de la presencia o ausencia del anticuerpo se realiza en una muestra de sangre, suero o heces que se obtiene del sujeto. Un experto en la técnica apreciará fácilmente los métodos y sistemas que pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta. Estos métodos y sistemas incluyen, pero no se limitan a, ELISA, inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH), radioinmunoensayos y purificación por afinidad.

55 En diversas modalidades, la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de estas (como se describe anteriormente) se usa como sustrato o reactivo (por ejemplo, colector, trampa) para unir anticuerpos anti-vinculina (si están presentes).

60 En ciertas modalidades, detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de estas puede realizarse mediante la puesta en contacto de la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta con una muestra biológica que se obtiene del sujeto, con el propósito de aislar el anticuerpo que se une específicamente a la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta, en donde el aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta, indica la presencia del anticuerpo y la falta del aislamiento del anticuerpo que se une específicamente a la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta, indica la falta del anticuerpo. En

diversas modalidades, el fragmento de vinculina o sec. con núm. de ident.: 1 pueden ser los fragmentos como se describió en la presente descripción. A modo de ejemplo, una matriz de afinidad que comprende vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta, puede unirse a un soporte sólido; la muestra biológica puede contactar la matriz de afinidad para producir un complejo de afinidad entre el anticuerpo y la matriz (si el anticuerpo está presente); el complejo de afinidad entre el anticuerpo y la matriz puede separarse del resto de la muestra biológica; y el anticuerpo puede liberarse de la matriz de afinidad. En otro ejemplo, un marcador (por ejemplo, un marcador de fluorescencia) puede colocarse sobre la vinculina, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta; la vinculina marcada, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta, puede ponerse en contacto con la muestra biológica para permitir que el anticuerpo (si está presente) se una específicamente a la vinculina marcada, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta. En diversas modalidades, la vinculina marcada, sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de esta puede separarse y analizarse por su unión al anticuerpo.

#### Terapia

Diversas modalidades proporcionan un método para seleccionar una terapia para un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia para un sujeto que lo necesita. En diversas modalidades, el método comprende: detectar la presencia de anticuerpos anti-vinculina; y seleccionar una terapia para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. La selección de una terapia como se usa en la presente descripción incluye, pero no se limita a seleccionar, elegir, prescribir, aconsejar, recomendar, instruir o asesorar al sujeto con respecto al tratamiento. En diversas modalidades, el método comprende, además, administrar la terapia para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En diversas modalidades, la terapia es una terapia como se describe en la presente descripción. En diversas modalidades, la terapia disponible comprende administrar un curso de terapia con antibióticos para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En diversas modalidades, la terapia es una terapia disponible en la técnica anterior.

En diversas modalidades, detectar la presencia de anticuerpos anti-vinculina puede realizarse como se describe por los métodos o sistemas de la presente invención.

En diversas modalidades, el sujeto puede ser un sujeto que presente uno o más síntomas del trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia; por ejemplo, como se discute en la presente descripción.

En diversas modalidades, el método comprende: detectar la presencia de anticuerpos anti-vinculina; y seleccionar un curso de terapia con antibióticos para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En diversas modalidades, el método comprende, además, administrar el curso de la terapia con antibióticos para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia.

En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia puede ser parte del síndrome del intestino irritable (IBS), C-IBS, D-IBS, A-IBS (también conocido como M-IBS), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), dispepsia funcional, síndrome de intestino irritable posinfeccioso (PI-IBS), sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), gastroparesia, gastroenteritis alérgica/eosinofílica, constipación, constipación crónica, pseudoobstrucción, cistitis intersticial, síndrome del intestino permeable, o fibromialgia. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es IBS. En ciertas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es GERD. En ciertas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es dispepsia funcional.

Los ejemplos de antibióticos incluyen, pero no se limitan a los aminoglucósidos (por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina), ansamicinas (por ejemplo, geldanamycin, herbimicina), carbacefem (por ejemplo, loracarbef), carbapenem (por ejemplo, ertapenem, doripenem, imipenem, cilastatin, meropenem), cefalosporinas (por ejemplo, de primera generación: cefadroxil, cefazolin, cefalotin, cefalexin; de segunda generación: cefaclor, cefamandol, cefoxitin, cefprozil, cefuroxima; de tercera generación: cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona; de cuarta generación: cefepima; de quinta generación: ceftobiprol), glicopéptidos (por ejemplo, teicoplanin, vancomicina), macrólidos (por ejemplo, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina), monobactamas (por ejemplo, aztreonam), penicilinas (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina), polipéptidos antibióticos (por ejemplo, bacitracina, colistina, polymixin B), quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina), rifamicinas (por ejemplo, rifampicina o rifampin, rifabutina, rifapentina, rifaximina), sulfonamidas (por ejemplo, mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol (co-trimoxazol, "tmp-smx"), y tetraciclinas (por ejemplo, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina) así como también arsenamina, cloramfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolid, metronidazol, mupirocin, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, combinación quinupristin/dalfopristin, y tinidazol, o una combinación de estos. En diversas modalidades, los antibióticos son una combinación de rifaximina y neomicina. En

diversas modalidades, los antibióticos son una combinación de rifaximina y doxiciclina. En diversas modalidades, los antibióticos son una combinación de rifaximina y metronidazol.

5 En diversas modalidades, los antibióticos son antibióticos no absorbibles. Los ejemplos de antibióticos no absorbibles incluyen, pero no se limitan a rifaximina, neomicina, bacitracina, vancomicina, teicoplanina, ramoplanina y paramomicina.

10 Diversas modalidades proporcionan métodos para tratar un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia tratados pueden ser el síndrome del intestino irritable (IBS), C-IBS, D-IBS, A-IBS (también conocido como M-IBS), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), dispepsia funcional, síndrome de intestino irritable posinfeccioso (PI-IBS), sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO), enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), gastroparesia, gastroenteritis alérgica/eosinofílica, constipación, constipación crónica, pseudoobstrucción, cistitis intersticial, síndrome del intestino permeable, o fibromialgia. En diversas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es IBS. En ciertas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es GERD. En ciertas modalidades, el trastorno de la motilidad gastrointestinal es dispepsia funcional.

20 En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina y administrar el agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina a un sujeto que lo necesite para neutralizar o inhibir el anticuerpo anti-vinculina.

En diversas modalidades, el agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina es un polipéptido capaz de unirse al anticuerpo anti-vinculina y neutralizar o inhibir su función.

25 En diversas modalidades, el agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina es un polipéptido capaz de unirse a un sitio de unión con el antígeno del anticuerpo anti-vinculina. Si desear adherirse a ninguna teoría particular, los inventores creen que estos polipéptidos pueden servir como señuelo para el anticuerpo anti-vinculina. En diversas modalidades, los polipéptidos son pentapéptidos CDT como se describe por Lucchese y Delfinoen (*Developing an anti-Campylobacter jejuni vaccine*. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2012; Early Online: 1-6).

30 En diversas modalidades, el agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina es una molécula pequeña capaz de unirse al anticuerpo anti-vinculina y neutralizar o inhibir su función.

35 En diversas modalidades, el agente neutralizante o inhibidor del anticuerpo anti-vinculina es una molécula pequeña capaz de unirse a un sitio de unión con el antígeno del anticuerpo anti-vinculina.

40 En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un agente para cambiar la vinculina de un estado inactivo a un estado activo; y administrar el agente a un sujeto que lo necesite para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia.

En diversas modalidades, el agente para cambiar la vinculina de un estado inactivo a un estado activo es una molécula pequeña capaz de activar la vinculina.

45 En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un agonista de vinculina; y administrar el agonista de vinculina a un sujeto que lo necesita para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el agonista de vinculina puede ser un péptido activador de vinculina (VAP) como se describe por Nelson y otros, en *Vinculin Activators Target Integrins from Within the Cell to Increase Melanoma Sensitivity to Chemotherapy*, MOL CANCER RES 9 de junio de 2011; 712 (publicado en línea el 1 de abril, 2011). En diversas modalidades, el VAP puede ser los residuos 500-633 de la proteína invasina IpaA de *Shigella*.

La secuencia de la proteína IpaA de Shigella:

5           MHNVNNTQAP   TFLYKATSPS   STEYSELKSK   ISDIHSSQTS   LKTPASVSEK  
 ENFATSFNQK   CLDFLFSSSG   KEDVLRSIYS   NSMNAYAKSE   ILEFSNVLYS  
 LVHQGNLNF   NEKGLQKIVA   QYSELIKDK   LSQDSAFGPW   SAKNKKLHQL  
 RQNIHRLAL   LAQQHTSGEA   LSLGQKLLNT   EVSSFIKNNI   LAELKLSNET  
 10          VSSLKLDL   DAQAKLAFDS   LRNQRKNTID   SKGFGIGKLS   RDLNTVAVFP  
 ELLRKVLNDI   LEDIKDSHPI   QDGLPTPPED   MPDGGPTPGA   NEKTSQPVII  
 YHINNDNRTY   DNRVFDNRVY   DNSYHENPEN   DAQSPTSQTN   DLLSRNGNSL  
 LNPQRALVQK   VTSVLPHSIS   DTVQTFANNS   ALEKVFNHTP   DNSDGIGSDL  
 15          LTTSSQERSA   NNSLSRGHRP   LNIQNSSTTP   PLHPEGVTSS   NDNSSDTTKS  
 SASLSHRVAS   QINKFNSNTD   SKVLQTDFLS   RNGDTYLTRE   TIFEASKKVT  
 NSLSNLISLI   GTKSGTQERE   LQEKSKDITK   STTEHRINNK   LKVTDANIRN  
 YVTETNADTI   DKNHAIYEKA   KEVSSALSKV   LSKIDD TSAE   LLTDDISDLK  
 20          NNNDITAENN   NIYKAAKDVT   TSLSKVLKNI   NKD (SEQ ID NO:6)

25          En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un activador de vinculina; y administrar el activador de vinculina a un sujeto que lo necesite para tratar el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia. En ciertas modalidades, el activador de vinculina puede ser talina, f-actina, a-catenina o combinaciones de estos.

30          Diversas modalidades proporcionan un método para tratar o inhibir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad. Se ha visto que hay menos pólipos en pacientes con IBS. Como tal, los anticuerpos anti-vinculina o los agentes que bloquean la vinculina pueden disminuir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad.

35          En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un agente para cambiar la vinculina de un estado activo a un estado inactivo; y administrar el agente a un sujeto que lo necesita para tratar o inhibir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad.

40          En diversas modalidades, el agente para cambiar la vinculina de un estado activo a un estado inactivo es una molécula pequeña capaz de inactivar la vinculina.

45          En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un antagonista de vinculina; y administrar el antagonista de vinculina a un sujeto que lo necesite para tratar o inhibir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad.

50          En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un inactivador de vinculina; y administrar el inactivador de vinculina a un sujeto que lo necesita para tratar o inhibir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad.

55          En diversas modalidades, el método puede comprender proporcionar un anticuerpo anti-vinculina capaz de inhibir la función de la vinculina; y administrar el anticuerpo anti-vinculina al sujeto para tratar o inhibir la progresión de los pólipos en el colon o la malignidad.

60          En diversas modalidades, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad con eficacia terapéutica de los agentes descritos en la presente descripción. El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y deseable, y que incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario, así como también para el uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser  
 65          sólidos, líquidos, semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

70          En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para administrarse a través de cualquier ruta de administración. El término "ruta de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye pero no se limitan a aerosol, nasal, oral, transmucosal, transdérmica o parenteral. La administración "transdérmica" puede lograrse mediante el uso de una crema tópica o ungüento o por medios de un parche transdermal. Por la vía de la ruta tópica, las composiciones farmacéuticas basadas en los compuestos de acuerdo a la invención pueden formularse para tratar la piel y las membranas mucosas y están en la forma de ungüentos, cremas, leches, sales, polvos, almohadillas impregnadas, soluciones, geles, aerosoles, lociones o suspensiones. Ellas pueden estar, además, en la forma de microesferas o  
 75          nanoesferas o vesículas lipídicas o vesículas de polímeros o parches de polímeros e hidrogeles que permiten la liberación controlada. Estas composiciones de ruta tópica pueden estar tanto en formas anhidras o en formas acuosas

5 en dependencia de la indicación clínica. El término "parenteral" se refiere a la ruta de administración que se asocia generalmente con una inyección, que incluye inyección intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. Por la vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados. Por la vía de la ruta enteral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de tabletas, cápsulas de gel, tabletas recubiertas de azúcar, jarabes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o vesículas de polímeros que permiten la liberación controlada. Por la vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección.

10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener, además, cualquier portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente descripción, se refiere a un material, composición, o vehículo farmacéuticamente aceptable que se encarga de llevar o transportar un compuesto de interés a partir de un tejido, órgano, o porción del cuerpo hasta otro tejido, órgano, o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un líquido o sólido de relleno, diluyente, excipiente, solvente, o material encapsulante, o una combinación de estos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el hecho de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Este debe ser, además, adecuado para usar en contacto con cualquier tejido u órgano con el cual puede ponerse en contacto, lo que significa que no debe portar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que excesivamente pese más que sus beneficios terapéuticos.

25 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden ser, además, encapsuladas, llevadas a tabletas o preparadas en una emulsión de jarabe para la administración oral. Pueden añadirse los portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para incrementar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabes, aceite de maní, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. El portador puede incluir, además, un material de liberación sostenida, tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato, solo o con una cera.

30 Las preparaciones farmacéuticas se hacen mediante las regulaciones de las técnicas convencionales de farmacia que involucran la molienda, mezclado, granulación, y compresión, cuando son necesarias, para las formas de tabletas; o molienda, mezclado y relleno para las formas de cápsula de gelatina dura. Cuando se usa un portador líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida puede administrarse directamente p.o., o como relleno dentro de una cápsula de gelatina blanda.

35 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden suministrarse en una cantidad con eficacia terapéutica. La cantidad con eficacia terapéutica precisa es aquella cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará en dependencia de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a las características del compuesto terapéutico (que incluyen actividad, farmacocinética, farmacodinamia, y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (que incluyen edad, sexo, estadio y tipo de enfermedad, condición física general, capacidad de respuesta a una dosis dada, y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la ruta de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar la cantidad con eficacia terapéutica a través de la rutina de experimentación, por ejemplo, mediante el monitoreo de la respuesta del sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste de la dosificación en consecuencia. Para una guía adicional, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20ma. Edición, Williams Wilkins PA, USA) (2000).

## 50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no se deben interpretar como limitante del alcance de la invención. Hasta el punto que se mencionan los materiales específicos, es sólo para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

### 55 Ejemplo 1

#### Métodos

60 Se reclutaron sujetos controles sanos, sujetos con IBS y sujetos con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y se les recolectó suero. El ELISA se preparó mediante el recubrimiento de las placas de 96 pocillos con cdtB recombinante y vinculina humana. Después del recubrimiento, se realizó una curva de calibración para cdtB y vinculina mediante el uso del anticuerpo comercial purificado anti-cdtB y el anticuerpo anti-vinculina humana. El suero de los sujetos controles sanos, con IBS e IBD se añadió a los pocillos y se examinó. Los pocillos se incubaron durante 60 minutos antes del lavado y de la aplicación de los anticuerpos secundarios.

Ejemplo 2

Anticuerpos anti-CdtB

5 Para determinar el papel de CdtB en el desarrollo del IBS, se desarrollaron dos anticuerpos para CdtB de *C. jejuni* 81-176. El primero fue a través de la inmunización de conejos con un residuo de 18 aminoácidos identificado como altamente antigénico (haAB) mediante el modelado de proteína (AnaSpec, San Jose, CA). El segundo se desarrolló a través de la inmunización de conejos con el péptido CdtB casi completo (wAb). Para confirmar la selectividad del suero de conejo a CdtB, se corrieron lisados de *C. jejuni* 81-176, en un gel para western con y sin bloqueo con la proteína CdtB para verificar una banda a la altura de 28kDa. Con esta validación, el wAb se usó a través de los experimentos restantes.

Ejemplo 3

15 Exposición aguda a *C. jejuni* y CdtB en ratas con infección aguda por *C. jejuni*

Para determinar el papel de CdtB en nuestro modelo animal, examinamos el tejido del íleon en ratas con infección aguda por *C. jejuni*. Las ratas se inocularon mediante sonda oral con  $10^8$  cfu/mL de *C. jejuni* 81-176. El día 2, se sacrificaron las ratas y se resecaron secciones de íleon, se fijaron en formalina al 10 % (VWR, Radnor, PA) y se prepararon las secciones para inmunohistoquímica. Como una comparación, los íleon de ratas vírgenes a *C. jejuni* se prepararon de manera similar. A estas secciones se aplicaron wAb y suero de conejo preimmune (control negativo) en secciones contiguas.

Ejemplo 4

25 Seguimiento de anticuerpos anti-CdtB en el íleon humano

Basado en la búsqueda de la actividad de wAb en la mucosa y en los elementos neurales de ambas ratas, controles e infectadas por *C. jejuni*, el estudio se repitió mediante el uso de secciones de íleon humano. Se identificaron humanos que se sometieron a ileocectomía por malignidades de colon, se montó una porción del íleon y se incubaron secciones con wAb y con suero preimmune para determinar, mediante el uso de la inmunohistoquímica, si había sustento para el mimetismo molecular.

Ejemplo 5

35 Identificación de la proteína neuronal entérica responsable del mimetismo molecular

Dado que el sistema nervioso entérico y en particular los ganglios y las neuronas entéricas son sitios de localización para los anticuerpos contra CdtB (wAb), se obtuvieron lisados de células madre neuronales entéricas. Los lisados se corrieron en gel para western con y sin bloqueo con la proteína CdtB mediante el uso de wAb y haAB para identificar una proteína potencial a la que se adhiere wAb. Esta se identificó a la altura de 117 kDa y posteriormente se usó inmunoprecipitación mediante el uso de wAb aplicado a perlas para extraer la proteína de interés. Esto se realizó mediante la unión --- de las proteínas a las perlas, después, se unieron los lisados de células madres de neuronas entéricas a  $2.5 \times 10^8$ . El efluente se corrió en un gel y la banda nuevamente identificó una proteína a la altura de 117 kDa. Esta banda se cortó y se usó espectroscopía de masas para analizar el contenido de proteína.

Después de la identificación de la proteína de interés, se usó microscopía confocal para determinar la colocalización de los anticuerpos con esta proteína en los tejidos en comparación con la afinidad tisular con CdtBwAb, tanto en ratas como en humanos.

Ejemplo 6

Detección de anticuerpos contra CdtB y vinculina en ratas expuestas a *C. jejuni*

55 En nuestro modelo animal de IBS posinfectioso validado, las ratas macho Sprague Dawley expuestas a *C. jejuni* 81-176 desarrollan sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, basado en conteos bacterianos totales por qPCR. Este fenotipo se aumenta por la exposición repetida a *C. jejuni*. En este experimento, se compararon 3 grupos de ratas. El primer grupo incluye ratas de control que nunca se expusieron a *C. jejuni* (n=20). En el segundo grupo de ratas, a los animales se les administró por sonda oral el vehículo en el período juvenil, y 2 meses más tarde recibieron por sonda oral  $10^8$  cfu/mL de *C. jejuni* 81-176 como adultos (J-/A+) (n=50). Al tercer grupo de animales se les administró por sonda oral  $10^8$  cfu/mL de *C. jejuni* 81-176 en el período juvenil y dos meses más tarde, como adultos se volvieron a exponer, mediante sonda oral, a  $10^8$  cfu/mL de *C. jejuni* 81-176 (J+/A+) (n=50). Después de la exposición en el periodo adulto, la eliminación de *C. jejuni* a partir del cultivo de las heces, se logró a los 30 días. Las ratas se sacrificaron mediante eutanasia 90 días después de la eliminación de *C. jejuni* para garantizar que fueran realmente posinfectiosas como se informó anteriormente. Durante la disección, las secciones de duodeno, yeyuno e íleon se fijaron con formalina y se resecaron por histología y la cuantificación bacteriana luminal se realizó mediante qPCR como se informó

anteriormente. En el momento de la eutanasia, se usó punción intracardiaca para recolectar sangre y el suero se separó y almacenó.

#### Ejemplo 7

5

#### Metodología del ELISA

Los antígenos (CdtB completa o vinculina (Novo, Short Hills, NJ)) se unieron a placas de 96 pocillos bajo condiciones de humedad durante toda la noche a 4°C mediante el uso de 100 µL/pocillo a 0.125 µg/mL de proteína en BBS (Pierce). Los pocillos se lavaron con PBS-T 0.05 % y se bloquearon con BSA al 0.5 % en PBS, 120 µL/pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se añadieron las muestras (suero de rata, suero humano) así como también los controles: wAB, Ac vinculina (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) a una dilución 1:100 en BSA/PBS al 0.5 % durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se añadieron 100 µL/pocillo del anticuerpo secundario, IgG humana, de rata o de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), a una dilución de 1:1000 en BSA/PBS 0.5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las placas se lavaron con PBS-T 0.05 % antes de añadir 100 µL/pocillo de la solución de sustrato (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y se leyeron en un lector de placas después de la aplicación de suero de rata o humano como se indica más abajo (BioTek Synergy HT)

#### Ejemplo 8

ELISA en ratas con y sin infección por *Campylobacter* y sobrecrecimiento,

Se analizó el suero de cada uno de los 3 grupos de ratas: no infectado, exposición única a *Campylobacter* como adulto, y doble infección, juvenil y como adultos. Se compararon las OD resultantes entre los 3 grupos, así como también las ratas segregadas con y sin sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (definidas como >2 SD sobre la media), como se publicó previamente. Finalmente, se creó una curva de correlación que compara el nivel de anticuerpos en suero con el grado de bacterias en el íleon.

#### Ejemplo 9

ELISA en humanos con IBS

Se usaron tres grupos de humanos para evaluar el título de los anticuerpos anti-CdtB y anti-vinculina. El primer grupo fue un grupo de controles sanos. Los sujetos controles sanos se definieron como sujetos, que según el cuestionario, no informaron alteración de la función intestinal, ni hinchazón ni dolor abdominal (cada uno menos de 10 mm en una escala VAS de 100 mm para el síntoma específico). El segundo grupo fue un grupo de sujetos de IBS con diarrea predominante, según los criterios de Roma III. El tercer grupo estuvo compuesto por 10 sujetos con la enfermedad de Crohn y 10 sujetos con colitis ulcerativa. El ELISA se estableció de manera similar al estudio de ratas. Los títulos de los anticuerpos anti-CdtB y anti-vinculina se compararon entre los 3 grupos. Además, se realizó una correlación entre anti-CdtB y anti-vinculina. Finalmente, en el ELISA se usaron dos proteínas no relacionadas, c-kit y latrofilina, para determinar el control de unión no específica en humanos con IBS.

#### Ejemplo 10

45

Inmunofluorescencia, Imágenes confocales de anticuerpos anti-cdtB, marcadores neurales y vinculina

Dado que había evidencia por inmunohistoquímica de la unión neuronal por wAb, particularmente en las regiones periganglionar y en las células intersticiales del plexo muscular profundo de Cajal (DMP-ICC), se realizaron experimentos de colocalización para comparar la localización de wAb con respecto a anti-c-kit (R&D Systems, Minneapolis, MN), S-100 (neuronal) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y PGP 9.5 (ganglio) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y anti-vinculina (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) todos generados en cabra. Para la comparación se tomaron imágenes microscópicas confocales de secciones contiguas de íleon de ratas y humanos.

Brevemente, las secciones de íleon de ratas infectadas de manera aguda y no infectadas por *C. Jejuni* se desparafinaron y se lavaron secuencialmente en xileno y etanol antes de recuperar el antígeno y de bloquear con suero. Se añadieron los anticuerpos primarios (1:200 wAb generados en conejo más los anticuerpos c-kit, S100, PGP 9.5, o vinculina generados en cabras a una dilución de 1:100) y se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de humedad. Las secciones tratados con anticuerpos primarios se lavaron en PBS y se incubaron con DAPI 1:30 (Invitrogen, Grand Island, NY) y anticuerpos secundarios: Alexa rojo 568 anti-cabra (Invitrogen, Grand Island, NY) para los anticuerpos c-kit, S100, PGP 9.5 o vinculina (1:300) y Alexa verde 488 anti-conejo (Invitrogen, Grand Island, NY) para wAB (1:300). Después de la incubación en condiciones oscuras y húmedas, se agregó Prolong Gold (Invitrogen, Grand Island, NY) y la sección se cubrió con cubre objeto de vidrio para su visualización bajo Microscopio Confocal (microscopio Leica TCS SP5 X, escáner digital de portaobjetos Leica SCN400 F).

65

Ejemplo 11

Expresión génica de vinculina en ratas con y sin SIBO

5 Se extrajo ARN de tejido del íleon de ratas (Qiagen) a partir de 3 meses después de la infección por *C. jejuni* y del control de animales no infectados y se convirtió en cDNA mediante transcripción inversa iScript (Bio Rad, Hercules, CA). Se realizó el PCR cuantitativo con cebadores específicos para vinculina de rata y se normalizó respecto a expresión del gen de beta actina.

10 Cebadores

15	beta actina <sup>1</sup>	FW: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA (sec. con núm. de ident.:2)	Amp: 150bp
		REV: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG (sec. con núm. de ident.:3)	
20	Vinculina <sup>2</sup>	FW: GCCAAGCAGTGACAGATAA (sec. con núm. de ident.:4)	Amp: 273bp
		REV: TCTTCTAACCCAGCGCAGT (sec. con núm. de ident.:5)	
<sup>1</sup> Referencia: Qian-Qian Liang y otros, (2010) Herb Formula "Fufangqishe-Pill" Prevents Upright Posture-Induced Intervertebral Disc Degeneration at the Lumbar in Rats. J PharmacolSci 113: 23 - 31) <sup>2</sup> Referencia: Zhang y otros, Proteome Science 2010 8:12 (doi:10.1186/1477-5956-8-12)			

Ejemplo 12

25 Análisis estadístico

La comparación de los niveles de anti-CdtB y anti-vinculina entre los grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Las curvas de correlación entre los recuentos de bacterias y los títulos de anticuerpos se compararon mediante la correlación de Pearson. La correlación de Pearson se usó, además, para comparar anti-CdtB y anti-vinculina en humanos. Para la determinación de un ELISA positivo y negativo se realizó Chi-cuadrado. Para la comparación de ELISA con respecto a los recuentos de colonias de la flora del intestino delgado, se usó una correlación por rangos de Pearson. Finalmente, los umbrales para anti-CdtB (>2.0 OD) y anti-vinculina (>1.2 OD) como un método de diagnóstico de IBS comparó a los controles y a los sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal. Las características de la prueba, tales como la sensibilidad y la especificidad, se determinaron en base a estos umbrales. Se determinó que las diferencias entre los grupos eran significativas si  $P < 0.05$ , y los datos se expresaron como la media  $\pm$  SD.

Ejemplo 13

40 Resultados

En el estudio participaron 19 controles sanos, 20 sujetos con IBD y 42 sujetos con IBS. Los datos demográficos fueron similares entre los grupos. Para la detección de anti-cdtB, se estableció como positiva una densidad óptica de  $\geq 2.0$  y para la detección de anticuerpos anti-vinculina humana se estableció una OD de  $\geq 1.2$ . Basado en estos puntos de corte, mediante el uso de anti-vinculina o anti-cdtB, el diagnóstico diferencial de IBS respecto a la IBD o a los controles sanos fue exitoso (Tabla 1a). Como el anti-cdtB es anti-vinculina, se esperaba que los títulos de anti-cdtB en suero en todos los sujetos corresponderían a anti-vinculina humana, y esto se encontró que era cierto ( $R = 0.58$ ,  $P < 0.001$ ).

50 Tabla 1a

	IBS versus todos los grupos		IBS versus Sanos		IBS versus IBD	
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
55 <b>Anti vinculina</b>	58.6	94.1	58.6	87.5	58.6	100

## Ejemplo 14

## Validación de los anticuerpos Anti CdtB

5 Para validar los anticuerpos anti-CdtB, se prepararon transferencias Western con CdtB purificado. Mediante el uso de ambos anticuerpos generados para CdtB completa (wAb) (figura 1a) y el anticuerpo generado para la secuencia de 18 residuos altamente antigénica de CdtB (haAb) (figura 1b) ambos reconocieron el CdtB como una banda activa a la altura de 27kDa (el peso molecular de CdtB). El suero de conejo preinmune no reconoce a CdtB y cuando se bloqueó el haAb con el péptido no resultó en una banda visible (figura 1c).

10

Para validar que el anticuerpo reconoció CdtB en *C. jejuni*, se preparó otra transferencia western y se corrió con un lisado de *C. jejuni* 81-176. Esto demostró que wAb (figura 2a) y haAb (figura 2b) reconocieron el CdtB como una banda activa a la altura de 27 kDa (el peso molecular de CdtB). El bloqueo del haAb con el péptido eliminó la detección de una banda a la altura de 27 kDa (figura 2c).

15

## Ejemplo 15

wAb en ratas expuestas y no expuestas a *C. jejuni*

20 En este estudio se compararon dos grupos de ratas mediante el uso de la tinción inmunespecífica. En las figuras 3a y b, se examina el íleon de rata 2 días después de la administración, mediante sonda oral, de *C. jejuni* 81-176 vivos. El suero preinmune no produjo tinción. Las ratas expuestas a *C. jejuni* 81-176 con infección activa demostraron una tinción extensa para el wAb, que incluye la superficie mucosal y las criptas. Los componentes profundos de los tejidos más identificados fueron los ganglios mientéricos, las células intersticiales de Cajal y otras estructuras neurales. Una localización idéntica se observó con la técnica de inmunofluorescencia (figuras 4a y b). Sin embargo, el mismo patrón se observó tanto con inmunohistoquímica (figuras 5a y b) e inmunofluorescencia (figuras 6a y b) para las ratas que nunca se expusieron a *C. jejuni*. Esto sugiere que el anticuerpo para CdtB reacciona de manera cruzada con una proteína natural de rata, localizada de manera más prominente en el área de los elementos neurales del intestino, lo que sugiere mimetismo molecular.

30

## Ejemplo 16

## Localización inmunohistoquímica de anti-CdtB en íleon humano

35 Mediante el uso del tejido del íleon humano de grosor total para la inmunohistoquímica, nuevamente el wAb aparece localizado en los elementos neurales del plexo mientérico (figuras 7a y b). Como estos sujetos no eran sujetos con IBS, se asumió que el anticuerpo contra CdtB se une a una proteína natural.

## Ejemplo 17

40

## Colocalización de anti-CdtB con otros marcadores neuronales.

Para demostrar la especificidad para el mimetismo de los componentes del sistema nervioso entérico, 3 anticuerpos marcadores (S-100 para las neuronas entéricas, PGP 9.5 para ganglios y anti-c-kit para ICC) se compararon con el anticuerpo wAb anti-CdtB. A partir de los estudios en todos los grupos de ratas, que incluyen las ratas control, el anti-CdtB se colocalizó tanto en ICC (con c-kit) (figuras 8a-c), como en neuronas (con S-100) (figuras 9a-c). Aunque se colocalizaron, la tinción para c-kit es una tinción de membrana celular y S-100 una tinción nuclear. El anti-CdtBwAb aparece localizado en los componentes citosólicos de las células neuronales entéricas (ambas, ICC y neuronas).

50

## Ejemplo 18

## Validación del mimetismo molecular en humanos

55 Para evaluar el potencial del anti-CdtBwAb para demostrar el mimetismo molecular en el intestino delgado humano, se montaron y tiñeron secciones de grosor completo del íleon de muestras de hemicolectomía derecha como anteriormente, en las ratas. Similar a las ratas, se observó la colocalización con c-kit, S-100 (figuras 10a-c) y PGP 9.5 (figuras 11a-c).

## Ejemplo 19

60

## Mimetismo molecular hacia una proteína citosólica de neuronas entéricas

65 Mediante el uso de lisados de células madres de neuronas entéricas, los anticuerpos wAb anti-CdtB demostraron una banda a la altura de 117kDa (figura 12 a y c). Mediante el fraccionamiento de los lisados, la banda de 117 kDa se localizó en la fracción citosólica del lisado (figura 12a). En los experimentos de bloqueo que usan el CdtB completo para bloquear el anticuerpo, se bloquea la unión a esta proteína de 117 kDa (figura 12a). La espectroscopía de masas

identificó la proteína candidata en esta banda como la vinculina. En el tejido humano, la microscopía confocal demuestra la colocalización de vinculina y wAb (figuras 13a-c).

Ejemplo 20

5

Demostración de anti-CdtB in vivo en el modelo de IBS en ratas

10

15

Para demostrar el papel de los anticuerpos contra CdtB en el fenotipo del IBS posinfeccioso, se desarrolló un ELISA mediante el uso de anti-CdtB *C. jejuni*. En este estudio, ratas controles, ratas con una exposición única a *C. jejuni* y ratas con dos exposiciones a *C. jejuni*, con intervalo de 2 meses, se evaluaron y se compararon con respecto al resultado del sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, mediante el PCR de la flora entérica del intestino delgado. En la figura 14, es evidente que el anti-CdtB no solo depende de la infección previa con *C. jejuni*, sino además, del desarrollo de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado. Entre las ratas que recibieron *C. jejuni*, aquellas con sobrecrecimiento bacteriano tuvieron títulos más altos de anti-CdtB que aquellas sin sobrecrecimiento bacteriano, independientemente del número de infecciones con *C. jejuni*. Esto se demuestra, además, por la correlación significativa entre el anti-CdtB circulante y el mayor grado de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado basado en qPCR de bacterias totales (figura 15).

Ejemplo 21

20

Demostración de anti-CdtB y anti-vinculina en humanos con IBS posinfeccioso

25

En este experimento final, se recolectó suero de 43 humanos con IBS, 20 sujetos sanos y 20 sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal (10 sujetos con enfermedad de Crohn y 10 sujetos con colitis ulcerativa). Mediante el uso de los valores absolutos, los sujetos con IBS tenían el mayor título de anticuerpos anti-CdtB en comparación con la IBD o con los controles (figura 16). Mediante la referencia de una OD>2 como un diagnóstico del IBS y del IBS posinfeccioso, este umbral fue capaz de identificar el IBS con una sensibilidad del 85.7 % y una especificidad del 67.2 % en comparación con la enfermedad inflamatoria intestinal (Tabla 1b).

30

Tabla 1b. Prueba dinámica de anti-CdtB para el diagnóstico del IBS

		ELISA Positivo	
		Sí	No
IBS versus IBD	IBS	18	20
	IBD	3	17
Características de la prueba	Sensibilidad	85.7 %	
	Especificidad	67.2 %	

35

40

Mediante el uso de la vinculina como el sustrato del ELISA, la aplicación del suero preinmune en los pocillos produjo una respuesta muy baja. Sin embargo, la aplicación de wAb en los pocillos produjo una respuesta vigorosa. Esto sugiere que el anti-CdtAb reacciona fuertemente con la vinculina en el ELISA (figura 17). Cuando las pruebas de ELISA para vinculina se llevaron a cabo mediante el uso del suero de los tres grupos humanos, nuevamente hubo títulos significativamente más altos de anti-vinculina en sujetos con IBS.

45

Finalmente, el ELISA que usa latrofilina o c-kit no demostró ninguna diferencia entre IBS, controles y sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal, lo que sugiere que las diferencias no se debieron a una unión inespecífica (datos no mostrados).

50

Ejemplo 22

Los anticuerpos circulantes contra a la toxina de distensión citoletal B se correlacionan con el desarrollo de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado en un modelo de IBS posinfeccioso en ratas.

55

El nivel de anticuerpos anti-CdtB en suero en el modelo de IBS posinfeccioso en ratas se examinó y se correlacionó con el desarrollo de SIBO.

60

Métodos: Se obtuvieron ratas macho Sprague-Dawley (n = 100) como bebés y se asignaron al azar a tres grupos. El primer grupo se le administró, mediante sonda oral, *C. jejuni* 81-176 (10<sup>8</sup> cfu/mL) en el período juvenil y dos meses más tarde como adultos (J+/A+). Al segundo grupo se le administró, mediante sonda oral, *C. jejuni* solamente como adultos (J-/A+). El tercer grupo no se expuso nunca a *C. jejuni* (controles). Tres meses después de la infección en el período adulto todas las ratas se sacrificaron mediante eutanasia. Después de la eutanasia, se ligaron los segmentos de íleon, yeyuno y duodeno y se eliminaron como se describió previamente (Chatterjee, y otros). Para cada segmento intestinal, se extrajo el DNA del contenido luminal y se usó el qPCR mediante el uso de los cebadores bacterianos universales

65

5 para determinar la presencia o ausencia de SIBO. SIBO se define como recuentos bacterianos por encima de 2 desviaciones estándar sobre la media de los controles para cada segmento. Durante la eutanasia, se tomó sangre y se aisló el suero. Se recubrió una placa de 96 pocillos con CdtB a la que se añadió suero de rata y se incubó durante 90 minutos. Los pocillos se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario fluorescente y se leyeron en un lector de placas.

10 Resultados: El ELISA para la detección de anti-CdtB en el suero de las ratas controles demostró una densidad óptica (OD) de  $1.27 \pm 0.15$ . Todas las ratas expuestas a *C. jejuni* tuvieron una OD mayor que  $1.73 \pm 0.12$  ( $P < 0.05$ ). En el grupo J-/A+, la única exposición a *C. jejuni* resultó en SIBO en el 26 % de las ratas. En el grupo J+/A+ de ratas con doble exposición, se observó SIBO en el 46 % ( $P < 0.05$ ). Los títulos anti-CdtB fueron mayores si las ratas tenían SIBO, independientemente de que ellas hubiesen tenido una exposición única ( $1.79 \pm 0.31$ ) o doble ( $2.02 \pm 0.22$ ) a *C. jejuni*. Las ratas que no tenían SIBO tuvieron títulos  $< 1.7$ . El gráfico que relaciona el nivel de bacterias en el íleon contra los resultados del ELISA demostró una correlación entre los niveles de bacteria y los anti-CdtB ( $R = 0.3$ ,  $P < 0.05$ ).

15 Conclusiones: Los anticuerpos contra CdtB se desarrollan después de la exposición a *C. jejuni* pero parecen desarrollarse en un patrón que se relaciona más con el desarrollo de SIBO que con el número de exposiciones a *C. jejuni*. En base a la afinidad por la ICC y los ganglios, los inventores creen que estos anticuerpos son importantes para la fisiopatología del IBS quizás porque afectan la función motora del intestino que conduce a SIBO.

#### 20 Ejemplo 23

Los anticuerpos contra la toxina de distensión citoletal B y los autoanticuerpos contra la vinculina humana están aumentados en los sujetos con IBS.

25 En un modelo animal de IBS posinfeccioso, los anticuerpos contra CdtB se unen a los elementos neurológicos en la pared intestinal, que incluye las células intersticiales de Cajal (ICC) y los ganglios, a través de un proceso de mimetismo molecular/autoinmunidad. La proteína sobre estos nervios a la cual se produce este mimetismo se descubrió que era la vinculina, y en las ratas los anticuerpos contra vinculina predicen SIBO. Los inventores extrapolan estas pruebas de anticuerpos a humanos para determinar los títulos de anticuerpos anti-CdtB y anti-vinculina en el suero de sujetos con IBS y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD).

30 Métodos: Los sujetos consecutivos del IBS que cumplían los criterios de Roma III se reclutaron en una clínica de Motilidad GI ( $n = 45$ ). Además, se reclutaron 30 sujetos con IBD de una clínica de atención terciaria para IBD. Finalmente, se identificaron 20 controles sanos basados en un cuestionario de síntomas negativos. Todos los sujetos dieron su consentimiento y se obtuvieron muestras de suero. Se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) mediante el recubrimiento de placas de 96 pocillos tanto con  $0.4 \mu\text{g}$  de vinculina recombinante, o con CdtB purificada a  $0.4 \mu\text{g/mL}$  por pocillo. El suero de cada sujeto se añadió a los pocillos y se incubó durante 90 minutos. Los pocillos se lavaron y luego se añadieron los anticuerpos secundarios a cada pocillo. Las medidas de densidad óptica (OD) se determinaron mediante el uso de un lector de placas.

35 Resultados: En placas recubiertas con CdtB, la OD media para el suero del IBS fue  $1.89 \pm 0.12$ . Esto fue significativamente mayor con respecto a los sujetos con IBD ( $1.35 \pm 0.22$ ) ( $P < 0.05$ ) o los controles sanos ( $1.46 \pm 0.20$ ) ( $P < 0.05$ ). En las placas recubiertas con vinculina, la OD media para el suero del IBS fue de  $0.53 \pm 0.07$ . Esto fue significativamente mayor con respecto a los sujetos con IBD ( $0.21 \pm 0.09$ ) ( $P < 0.05$ ). Hubo una tendencia hacia una diferencia con respecto a los controles sanos ( $0.31 \pm 0.10$ ) ( $P = 0.11$ ). No hubo diferencias entre IBS-C o IBS-D para ambos anticuerpos.

40 Conclusiones: Ambos anticuerpos, los anti-CdtB y los anticuerpos autoinmunes anti-vinculina, se detectan en sujetos con IBS y se consideran elevados en IBS en comparación con los controles y la IBD. La detección de anti-CdtB y anti-vinculina sugiere indicios nuevos para el diagnóstico y la fisiopatología del IBS. Este es el primer estudio que relaciona la gastroenteritis aguda con un proceso autoinmune en el IBS.

#### 45 Ejemplo 24

50 El mimetismo molecular conduce a la autoinmunidad contra la vinculina en humanos: el eslabón perdido en la fisiopatología del IBS

Los inventores investigan el antígeno humano al que se une el anti-CdtB.

55 Métodos: Primeramente, se obtuvo tejido del íleon de grosor completo a partir de humanos que no padecen del IBS (a partir de hemicolectomía derecha). Las secciones del íleon se incubaron con anticuerpos purificados de conejo para CdtB, se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes. Los estudios de colocalización se realizaron con anti-c-kit (específico para ICC), S-100 (específico para neuronas) y PGP 9.5 (específico para ganglios). A continuación, se realizó la inmunoprecipitación mediante la generación de una columna con anti-CdtB a través de la cual se pasó un lisado de células neuronales entéricas humanas (Emory University). La proteína adherente al anti-CdtB se eluyó y se realizaron dos transferencias Western. Una se incubó con anti-CdtB y la otra con anti-CdtB preincubado con

la proteína CdtB (péptido de bloqueo). Se identificó una banda a la altura de 117 kDa, que se purificó y se identificó mediante espectroscopía de masa como vinculina humana. Con una alícuota de 0.4 ug de vinculina comercial se recubrió cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadió anti-CdtB a una serie de pocillos y en otra serie de pocillos se combinó anti-CdtB con proteína CdtB completa (péptido bloqueante).

5

Resultados: Mediante el uso del tejido del íleon humano de grosor completo, el anti-CdtB fue específico para ICC y ganglios. Esto se basó en la colocación de anti-CdtB con anti-c-kit, PGP 9.5 y S-100 (ver figura). Por tanto, parece que el anti-CdtB se relaciona con una proteína humana en ICC y ganglios. En base a la inmunoprecipitación, se identificó una banda de proteína a la altura de 117 kDa. Mediante el uso de espectroscopía de masas, esta proteína se identificó como vinculina humana. Posteriormente, la vinculina humana se obtuvo comercialmente y mediante ELISA, se demostró que el anti-CdtB tenía una alta afinidad por la vinculina humana, pero no por el péptido de control. La unión a vinculina se bloqueó por el péptido CdtB.

10

Conclusiones: En la fisiopatología del IBS posinfeccioso, los sujetos desarrollan anticuerpos contra CdtB que tienen reactividad cruzada, a través del mimetismo molecular, con la vinculina, una proteína del citoesqueleto de la membrana celular que es importante en la migración y en la adherencia de las células neurales. Dada nuestra información emergente acerca de niveles reducidos de vinculina en ratas posinfecciosas, el mimetismo molecular a vinculina puede ser importante para la causa de SIBO y del IBS a través de los efectos sobre las ICC y los ganglios.

15

20

#### Ejemplo 25

La expresión de vinculina se reduce en un modelo animal del IBS posinfeccioso

Los inventores evalúan la expresión de vinculina en el modelo de rata posinfecciosa.

25

Métodos: Las ratas Sprague Dawley se dividieron en 3 grupos. Las ratas del grupo 1 sirvieron como controles (n=20). A las ratas del grupo 2 se les administró, mediante sonda oral,  $10^8$ cfu/mL *C. jejuni* en el período adulto (J-/A+). A las ratas del grupo 3 se les administró, mediante sonda oral, *C. jejuni* en el período juvenil y después nuevamente 2 meses más tarde, una segunda vez como adultos. Las ratas infectadas, se sacrificaron mediante eutanasia 3 meses después de la eliminación de *C. jejuni*. En el momento de la eutanasia, las secciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) se ligaron y los contenidos bacterianos totales se cuantificaron por qPCR como se describió previamente. Además, se obtuvo un segmento de intestino medio y se conservó en la solución ARN later. Después de la homogenización, la extracción de RNA y la conversión a cDNA, se usó el qPCR para determinar el nivel de vinculina en la pared intestinal después de normalizar con respecto a la  $\beta$ -actina. El nivel de vinculina se evaluó en base al número de infecciones por *C. jejuni* y la presencia o ausencia de SIBO en este modelo animal.

30

35

Resultados: En base a los niveles bacterianos normales en los segmentos del intestino delgado de sujetos normales, se identificó SIBO en 26 % y 46 % de las ratas con exposición simple y doble a *C. jejuni*. En general, la expresión de vinculina se redujo en el intestino delgado de las ratas expuestas a *C. jejuni* ( $0.058 \pm 0.0053$ ) en comparación con las ratas controles ( $0.087 \pm 0.0053$ ) ( $P < 0.001$ ). Además, hubo una mayor reducción de vinculina con dos exposiciones a *C. jejuni* en comparación con una sola exposición (ver figura) ( $P < 0.0001$ ). Además, hubo una tendencia a disminuir la expresión de vinculina en ratas con SIBO ( $P = 0.05$ ).

40

Conclusiones: La expresión de vinculina se reduce por la exposición a *C. jejuni*. Esta reducción depende del número de exposiciones a *C. jejuni*, con una mayor reducción en las ratas que se expusieron dos veces a *C. jejuni*. Finalmente, el SIBO se asocia con un nivel más bajo de expresión de vinculina. La vinculina puede ser importante en la patogénesis del IBS posinfeccioso.

45

50

#### Ejemplo 26

En los Centros Médicos Cedars-Sinai y Beth Israel Deaconess se reclutaron sujetos (18-65 años) con IBS positivo según criterios de Roma. Los sujetos se evaluaron por síntomas y características demográficas, y posteriormente se les recolectaron los sueros. Los sujetos se excluyeron si tenían enfermedad GI concomitante, cirugía GI previa, adherencias, enfermedad tiroidea inestable, diabetes o HIV. Se reclutaron controles sanos basados en la conclusión de un cuestionario de síntomas GI. En este cuestionario, los sujetos tenían que tener <10 marcas para hinchazón, diarrea, dolor abdominal y estreñimiento inclusive sobre un VAS de 0-100. Los sujetos con enfermedad inflamatoria intestinal se reclutaron en un centro médico experto de atención terciaria. Se excluyeron los sujetos con enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa si existían antecedentes de terapia biológica y el uso actual de prednisona. Para realizar el ELISA y determinar los anticuerpos contra vinculina recombinante humana se usaron los sueros de los 3 grupos.

55

60

En total se evaluaron 165 sujetos con IBS, 30 sujetos con IBD y 26 sujetos controles sanos. Los datos demográficos fueron similares entre los grupos. En general, el grupo IBS tuvo una densidad óptica significativamente mayor en el ELISA para los anticuerpos anti-vinculina en comparación con los sujetos IBD y los sujetos sanos. (Figura 19) Mediante la comparación de los dos centros principales que reclutaron pacientes con IBS, los resultados de ambos centros fueron igualmente anormales ( $P = NS$ ). Curiosamente, en los sujetos con antecedentes de gastroenteritis aguda, incluso se observaron niveles de anticuerpos más altos ( $P < 0.05$ ).

65

Los anticuerpos anti-vinculina son elevados en el IBS en comparación con los que no tienen IBS. Esta es la primera prueba diagnóstica para el IBS basada en el suero y en un mecanismo fisiopatológico del IBS mediante la gastroenteritis aguda desencadenado por el mimetismo molecular y la autoinmunidad.

5

## Referencias

1. Drossman, D.A., Camilleri, M., Mayer, E.A., and Whitehead, W.E. 2002. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123:2108-2131.
- 10 2. Pimentel, M. 2010. Evaluating a bacterial hypothesis in IBS using a modification of Koch's postulates: part 1. *Am J Gastroenterol* 105:718-721.
3. Pimentel, M., Lembo, A., Chey, W.D., Zakko, S., Ringel, Y., Yu, J., Mareya, S.M., Shaw, A.L., Bortey, E., and Forbes, W.P. 2011. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *NEngl JMed* 364:22-32.
- 15 4. Halvorson, H.A., Schlett, C.D., and Riddle, M.S. 2006. Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 101:1894-1899; quiz 1942.
5. Thabane, M., Kottachchi, D.T., and Marshall, J.K. 2007. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 26:535-544.
6. Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., and Neal, K.R. 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47:804-811.
- 20 7. Mearin, F., Perez-Oliveras, M., Perello, A., Vinyet, J., Ibanez, A., Coderch, J., and Perona, M. 2005. Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a *Salmonella* gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology* 129:98-104.
8. Okhuysen, P.C., Jiang, Z.D., Carlin, L., Forbes, C., and DuPont, H.L. 2004. Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North American travelers to Mexico. *Am J Gastroenterol* 99:1774-1778.
- 25 9. Ji, S., Park, H., Lee, D., Song, Y.K., Choi, J.P., and Lee, S.I. 2005. Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with *Shigella* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 20:381-386.
10. Pimentel, M., Chatterjee, S., Chang, C., Low, K., Song, Y., Liu, C., Morales, W., Ali, L., Lezcano, S., Conklin, J., et al. 2008. A new rat model links two contemporary theories in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 53:982-989.
- 30 11. Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., and Quigley, E.M. 2011. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 106:329-336.
12. Langhorst, J., Junge, A., Rueffer, A., Wehkamp, J., Foell, D., Michalsen, A., Musial, F., and Dobos, G.J. 2009. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 104:404-410.
- 35 13. Liebrechts, T., Adam, B., Bredack, C., Roth, A., Heinzl, S., Lester, S., Downie-Doyle, S., Smith, E., Drew, P., Talley, N.J., et al. 2007. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132:913-920.
14. Scully, P., McKernan, D.P., Keohane, J., Groeger, D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Quigley, E.M. 2010. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *Am J Gastroenterol* 105:2235-2243.
- 40 15. Dinan, T.G., Clarke, G., Quigley, E.M., Scott, L.V., Shanahan, F., Cryan, J., Cooney, J., and Keeling, P.W. 2008. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am J Gastroenterol* 103:2570-2576.
16. Barkhordari, E., Rezaei, N., Ansari-pour, B., Larki, P., Alighardashi, M., Ahmadi-Ashtiani, H.R., Mahmoudi, M., Keramati, M.R., Habibollahi, P., Bashashati, M., et al. 2010. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J Clin Immunol* 30:74-79.
- 45 17. Villani, A.C., Lemire, M., Thabane, M., Belisle, A., Geneau, G., Garg, A.X., Clark, W.F., Moayyedi, P., Collins, S.M., Franchimont, D., et al. 2010. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 138:1502-1513.
18. Taylor, D.N., Echeverria, P., Pitarangsi, C., Seriwatana, J., Bodhidatta, L., and Blaser, M.J. 1988. Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J Clin Microbiol* 26:863-868.
- 50 19. Calva, J.J., Ruiz-Palacios, G.M., Lopez-Vidal, A.B., Ramos, A., and Bojalil, R. 1988. Cohort study of intestinal infection with *campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1:503-506.
20. Oberhelman, R.A., Gilman, R.H., Sheen, P., Taylor, D.N., Black, R.E., Cabrera, L., Lescano, A.G., Meza, R., and Madico, G. 1999. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 134:15-20.
- 55 21. Taylor, D.N., Perlman, D.M., Echeverria, P.D., Lexomboon, U., and Blaser, M.J. 1993. *Campylobacter* immunity and quantitative excretion rates in Thai children. *J Infect Dis* 168:754-758.
22. Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O., and Obi, C.L. 2002. Human *campylobacteriosis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 8:237-244.
- 60 23. Sorokin, M., Usein, C.R., Irimia, M., and Damian, M. 2007. A laboratory-based survey of *Campylobacter* infections in Prahova County. *Roum Arch Microbiol Immunol* 66:85-89.
24. Morales, W., Pimentel, M., Hwang, L., Kunkel, D., Pokkunuri, V., Basseri, B., Low, K., Wang, H., Conklin, J.L., and Chang, C. 2011. Acute and Chronic Histological Changes of the Small Bowel Secondary to *C. jejuni* Infection in a Rat Model for Post-Infectious IBS. *Dig Dis Sci*.

25. Jee, S.R., Morales, W., Low, K., Chang, C., Zhu, A., Pokkunuri, V., Chatterjee, S., Soffer, E., Conklin, J.L., and Pimentel, M. 2010. ICC density predicts bacterial overgrowth in a rat model of post-infectious IBS. *World J Gastroenterol* 16:3680-3686.
26. Vantrappen, G., Janssens, J., Hellems, J., and Ghoo, Y. 1977. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest* 59:1158-1166.
27. Nieuwenhuijs, V.B., Verheem, A., van Duijvenbode-Beumer, H., Visser, M.R., Verhoef, J., Gooszen, H.G., and Akkermans, L.M. 1998. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 228:188-193.
28. Sarna, S.K. 2008. Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the gut? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G372-390.
29. Der-Silaphet, T., Malysz, J., Hagel, S., Larry Arsenault, A., and Huizinga, J.D. 1998. Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 114:724-736.
30. Malysz, J., Thuneberg, L., Mikkelsen, H.B., and Huizinga, J.D. 1996. Action potential generation in the small intestine of W mutant mice that lack interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 271:G387-399.
31. Langton, P., Ward, S.M., Carl, A., Norell, M.A., and Sanders, K.M. 1989. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7280-7284.
32. Ordog, T., Ward, S.M., and Sanders, K.M. 1999. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 518 (Pt 1):257-269.
33. Streutker, C.J., Huizinga, J.D., Campbell, F., Ho, J., and Riddell, R.H. 2003. Loss of CD117 (c-kit)- and CD34-positive ICC and associated CD34-positive fibroblasts defines a subpopulation of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Surg Pathol* 27:228-235.
34. Vanderwinden, J.M., Liu, H., De Laet, M.H., and Vanderhaeghen, J.J. 1996. Study of the interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Gastroenterology* 111:279-288.
35. Ordog, T., Takayama, I., Cheung, W.K., Ward, S.M., and Sanders, K.M. 2000. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 49:1731-1739.
36. Bassotti, G., Villanacci, V., Maurer, C.A., Fisogni, S., Di Fabio, F., Cadei, M., Morelli, A., Panagiotis, T., Cathomas, G., and Salerni, B. 2006. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut* 55:41-46.
37. Torihashi, S., Ward, S.M., Nishikawa, S., Nishi, K., Kobayashi, S., and Sanders, K.M. 1995. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 280:97-111.
38. Neal, K.R., Hebden, J., and Spiller, R. 1997. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 314:779-782.
39. Thornley, J.P., Jenkins, D., Neal, K., Wright, T., Brough, J., and Spiller, R.C. 2001. Relationship of *Campylobacter* toxigenicity in vitro to the development of postinfectious irritable bowel syndrome. *J Infect Dis* 184:606-609.
40. Gwee, K.A. 2005. Irritable bowel syndrome in developing countries—a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterol Motil* 17:317-324.
41. Dunlop, S.P., Jenkins, D., Neal, K.R., Naesdal, J., Borgaonker, M., Collins, S.M., and Spiller, R.C. 2003. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of prednisolone in post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 18:77-84.
42. Barbara, G., Stanghellini, V., Cremon, C., De Giorgio, R., Fronzoni, L., Serra, M., and Corinaldesi, R. 2009. Aminosalicilates and other anti-inflammatory compounds for irritable bowel syndrome. *Dig Dis* 27 Suppl 1:115-121.
43. Dorofeyev, A.E., Kiriyan, E.A., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Elin, A.F. 2011. Clinical, endoscopic and morphological efficacy of mesalazine in patients with irritable bowel syndrome. *Clin Exp Gastroenterol* 4:141-153.
44. Spiller, R., and Campbell, E. 2006. Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 22:13-17.
45. O'Sullivan, M., Clayton, N., Breslin, N.P., Harman, I., Bountra, C., McLaren, A., and O'Morain, C.A. 2000. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 12:449-457.

Diversas modalidades de la invención se describen anteriormente en la Descripción Detallada. Aunque estas descripciones describen directamente las modalidades anteriores, se entiende que los expertos en la técnica pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las modalidades específicas mostradas y descritas en la presente descripción. Cualquiera de tales modificaciones o variaciones que caen dentro del alcance de esta descripción se incluyen también de esta manera. A menos que se indique específicamente, es la intención de los inventores que se les confiera a las palabras y frases en la descripción y reivindicaciones los significados usuales y ordinarios para los expertos en las aplicaciones de la técnica(s).

La descripción anterior de diversas modalidades de la invención conocida para el solicitante al momento de presentar la solicitud se presentan con propósitos de ilustración y descripción. La presente descripción no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención en la forma precisa publicada y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Las modalidades descritas sirven para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica y para capacitar a otros con experiencia en la técnica para utilizar la invención en diversas modalidades y con varias modificaciones como se ajusta al uso particular contemplado. Por tanto, es la intención que la invención no se limite a las modalidades particulares descritas para llevar a cabo la invención.

Se entenderá por aquellos dentro del estado de la técnica que, en general, los términos usados en la presente descripción deben entenderse generalmente como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "que incluye" debe

interpretarse como "que incluye pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", etc.).

Listado de Secuencias

- 5 <110> CENTRO MÉDICO CEDARS-SINAI  
PIMENTEL, Mark  
CHANG, Christopher
- 10 <120> Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la motilidad del intestino y de la vejiga, y de la fibromialgia
- <130> 065472-000379W000
- <150> 61/701,923
- 15 <151> 2012-09-17
- <150> 61/762,632
- <151> 2013-02-08
- 20 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 1066
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30

Met Pro Val Phe His Thr Arg Thr Ile Glu Ser Ile Leu Glu Pro Val  
1 5 10 15

Ala Gln Gln Ile Ser His Leu Val Ile Met His Glu Glu Gly Glu Val  
20 25 30

Asp Gly Lys Ala Ile Pro Asp Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala Val Gln  
35 40 45

Ala Ala Val Ser Asn Leu Val Arg Val Gly Lys Glu Thr Val Gln Thr  
50 55 60

Thr Glu Asp Gln Ile Leu Lys Arg Asp Met Pro Pro Ala Phe Ile Lys  
65 70 75 80

Val Glu Asn Ala Cys Thr Lys Leu Val Gln Ala Ala Gln Met Leu Gln  
85 90 95

Ser Asp Pro Tyr Ser Val Pro Ala Arg Asp Tyr Leu Ile Asp Gly Ser  
100 105 110

Arg Gly Ile Leu Ser Gly Thr Ser Asp Leu Leu Leu Thr Phe Asp Glu  
115 120 125

Ala Glu Val Arg Lys Ile Ile Arg Val Cys Lys Gly Ile Leu Glu Tyr  
130 135 140

ES 2 646 598 T3

Leu Thr Val Ala Glu Val Val Glu Thr Met Glu Asp Leu Val Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Thr Lys Asn Leu Gly Pro Gly Met Thr Lys Met Ala Lys Met Ile Asp  
 165 170 175  
 5 Glu Arg Gln Gln Glu Leu Thr His Gln Glu His Arg Val Met Leu Val  
 180 185 190  
 Asn Ser Met Asn Thr Val Lys Glu Leu Leu Pro Val Leu Ile Ser Ala  
 195 200 205  
 10 Met Lys Ile Phe Val Thr Thr Lys Asn Ser Lys Asn Gln Gly Ile Glu  
 210 215 220  
 Glu Ala Leu Lys Asn Arg Asn Phe Thr Val Glu Lys Met Ser Ala Glu  
 225 230 235 240  
 15 Ile Asn Glu Ile Ile Arg Val Leu Gln Leu Thr Ser Trp Asp Glu Asp  
 245 250 255  
 Ala Trp Ala Ser Lys Asp Thr Glu Ala Met Lys Arg Ala Leu Ala Ser  
 260 265 270  
 20 Ile Asp Ser Lys Leu Asn Gln Ala Lys Gly Trp Leu Arg Asp Pro Ser  
 275 280 285  
 Ala Ser Pro Gly Asp Ala Gly Glu Gln Ala Ile Arg Gln Ile Leu Asp  
 290 295 300  
 25 Glu Ala Gly Lys Val Gly Glu Leu Cys Ala Gly Lys Glu Arg Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Leu Gly Thr Cys Lys Met Leu Gly Gln Met Thr Asp Gln Val Ala  
 325 330 335  
 30 Asp Leu Arg Ala Arg Gly Gln Gly Ser Ser Pro Val Ala Met Gln Lys  
 340 345 350  
 Ala Gln Gln Val Ser Gln Gly Leu Asp Val Leu Thr Ala Lys Val Glu  
 355 360 365  
 35 Asn Ala Ala Arg Lys Leu Glu Ala Met Thr Asn Ser Lys Gln Ser Ile  
 370 375 380  
 40 Ala Lys Lys Ile Asp Ala Ala Gln Asn Trp Leu Ala Asp Pro Asn Gly  
 385 390 395 400

ES 2 646 598 T3

Gly Pro Glu Gly Glu Glu Gln Ile Arg Gly Ala Leu Ala Glu Ala Arg  
 405 410 415  
 5 Lys Ile Ala Glu Leu Cys Asp Asp Pro Lys Glu Arg Asp Asp Ile Leu  
 420 425 430  
 Arg Ser Leu Gly Glu Ile Ser Ala Leu Thr Ser Lys Leu Ala Asp Leu  
 435 440 445  
 10 Arg Arg Gln Gly Lys Gly Asp Ser Pro Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys  
 450 455 460  
 Gln Val Ala Thr Ala Leu Gln Asn Leu Gln Thr Lys Thr Asn Arg Ala  
 465 470 475 480  
 15 Val Ala Asn Ser Arg Pro Ala Lys Ala Ala Val His Leu Glu Gly Lys  
 485 490 495  
 Ile Glu Gln Ala Gln Arg Trp Ile Asp Asn Pro Thr Val Asp Asp Arg  
 500 505 510  
 20 Gly Val Gly Gln Ala Ala Ile Arg Gly Leu Val Ala Glu Gly His Arg  
 515 520 525  
 Leu Ala Asn Val Met Met Gly Pro Tyr Arg Gln Asp Leu Leu Ala Lys  
 530 535 540  
 25 Cys Asp Arg Val Asp Gln Leu Thr Ala Gln Leu Ala Asp Leu Ala Ala  
 545 550 555 560  
 Arg Gly Glu Gly Glu Ser Pro Gln Ala Arg Ala Leu Ala Ser Gln Leu  
 565 570 575  
 30 Gln Asp Ser Leu Lys Asp Leu Lys Ala Arg Met Gln Glu Ala Met Thr  
 580 585 590  
 Gln Glu Val Ser Asp Val Phe Ser Asp Thr Thr Thr Pro Ile Lys Leu  
 595 600 605  
 35 Leu Ala Val Ala Ala Thr Ala Pro Pro Asp Ala Pro Asn Arg Glu Glu  
 610 615 620  
 Val Phe Asp Glu Arg Ala Ala Asn Phe Glu Asn His Ser Gly Lys Leu  
 625 630 635 640  
 40 Gly Ala Thr Ala Glu Lys Ala Ala Ala Val Gly Thr Ala Asn Lys Ser  
 45

ES 2 646 598 T3

				645					650						655	
	Thr	Val	Glu	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	Val	Lys	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Thr
5				660					665					670		
	Pro	Gln	Val	Val	Ser	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn
			675					680					685			
	Gln	Ala	Ala	Tyr	Glu	His	Phe	Glu	Thr	Met	Lys	Asn	Gln	Trp	Ile	Asp
10		690					695					700				
	Asn	Val	Glu	Lys	Met	Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	Ile	Asp	Thr	Lys
	705					710				715						720
	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Ser	Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Lys	Asp	Leu	Asp	Lys
15					725					730					735	
	Cys	Lys	Val	Ala	Met	Ala	Asn	Ile	Gln	Pro	Gln	Met	Leu	Val	Ala	Gly
				740					745					750		
	Ala	Thr	Ser	Ile	Ala	Arg	Arg	Ala	Asn	Arg	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	Lys
20			755					760					765			
	Arg	Glu	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Pro	Lys	Phe	Arg	Glu	Ala	Val	Lys
	770					775						780				
	Ala	Ala	Ser	Asp	Glu	Leu	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Pro	Met	Val	Met	Asp
25		785				790					795					800
	Ala	Lys	Ala	Val	Ala	Gly	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Gly	Leu	Gln	Lys	Ser
					805					810					815	
	Phe	Leu	Asp	Ser	Gly	Tyr	Arg	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	Lys	Val	Arg
				820					825					830		
	Glu	Ala	Phe	Gln	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp
35			835					840					845			
	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Leu	Thr	Asp	Glu	Leu	Ala	Pro	Pro	Lys	Pro	Pro
		850					855					860				
	Leu	Pro	Glu	Gly	Glu	Val	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu
40						870					875					880
	Lys	Asp	Glu	Glu	Phe	Pro	Glu	Gln	Lys	Ala	Gly	Glu	Val	Ile	Asn	Gln
					885					890					895	
45																

ES 2 646 598 T3

Pro Met Met Met Ala Ala Arg Gln Leu His Asp Glu Ala Arg Lys Trp  
 900 905 910  
 5 Ser Ser Lys Gly Asn Asp Ile Ile Ala Ala Ala Lys Arg Met Ala Leu  
 915 920 925  
 10 Leu Met Ala Glu Met Ser Arg Leu Val Arg Gly Gly Ser Gly Thr Lys  
 930 935 940  
 15 Arg Ala Leu Ile Gln Cys Ala Lys Asp Ile Ala Lys Ala Ser Asp Glu  
 945 950 955 960  
 20 Val Thr Arg Leu Ala Lys Glu Val Ala Lys Gln Cys Thr Asp Lys Arg  
 965 970 975  
 25 Ile Arg Thr Asn Leu Leu Gln Val Cys Glu Arg Ile Pro Thr Ile Ser  
 980 985 990  
 30 Thr Gln Leu Lys Ile Leu Ser Thr Val Lys Ala Thr Met Leu Gly Arg  
 995 1000 1005  
 35 Thr Asn Ile Ser Asp Glu Glu Ser Glu Gln Ala Thr Glu Met Leu  
 1010 1015 1020  
 40 Val His Asn Ala Gln Asn Leu Met Gln Ser Val Lys Glu Thr Val  
 1025 1030 1035  
 45 Arg Glu Ala Glu Ala Ala Ser Ile Lys Ile Arg Thr Asp Ala Gly  
 1040 1045 1050  
 50 Phe Thr Leu Arg Trp Val Arg Lys Thr Pro Trp Tyr Gln  
 1055 1060 1065

45 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> construcción sintética

<400> 2  
 ggagattactgccctggctccta 23

55 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> construcción sintética

<400> 3  
 gactcatgtactctgcttgctg 24

65 <210> 4  
 <211> 20

ES 2 646 598 T3

<212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 5 <223> construcción sintética

<400> 4  
 gccaaagcagtgcacagataa 20

10 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> construcción sintética

<400> 5  
 20 tcttctaaccagcgagcagt 20

<210> 6  
 <211> 633  
 <212> PRT  
 <213> Shigella

25 <400> 6

30 Met His Asn Val Asn Asn Thr Gln Ala Pro Thr Phe Leu Tyr Lys Ala  
 1 5 10 15

Thr Ser Pro Ser Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Leu Lys Ser Lys Ile Ser  
 20 25 30

35 Asp Ile His Ser Ser Gln Thr Ser Leu Lys Thr Pro Ala Ser Val Ser  
 35 40 45

40 Glu Lys Glu Asn Phe Ala Thr Ser Phe Asn Gln Lys Cys Leu Asp Phe  
 50 55 60

45 Leu Phe Ser Ser Ser Gly Lys Glu Asp Val Leu Arg Ser Ile Tyr Ser  
 65 70 75 80

Asn Ser Met Asn Ala Tyr Ala Lys Ser Glu Ile Leu Glu Phe Ser Asn  
 85 90 95

50 Val Leu Tyr Ser Leu Val His Gln Asn Gly Leu Asn Phe Glu Asn Glu  
 100 105 110

55

ES 2 646 598 T3

5 Lys Gly Leu Gln Lys Ile Val Ala Gln Tyr Ser Glu Leu Ile Ile Lys  
 115 120 125  
 Asp Lys Leu Ser Gln Asp Ser Ala Phe Gly Pro Trp Ser Ala Lys Asn  
 130 135 140  
 10 Lys Lys Leu His Gln Leu Arg Gln Asn Ile Glu His Arg Leu Ala Leu  
 145 150 155 160  
 15 Leu Ala Gln Gln His Thr Ser Gly Glu Ala Leu Ser Leu Gly Gln Lys  
 165 170 175  
 20 Leu Leu Asn Thr Glu Val Ser Ser Phe Ile Lys Asn Asn Ile Leu Ala  
 180 185 190  
 25 Glu Leu Lys Leu Ser Asn Glu Thr Val Ser Ser Leu Lys Leu Asp Asp  
 195 200 205  
 30 Leu Val Asp Ala Gln Ala Lys Leu Ala Phe Asp Ser Leu Arg Asn Gln  
 210 215 220  
 Arg Lys Asn Thr Ile Asp Ser Lys Gly Phe Gly Ile Gly Lys Leu Ser  
 225 230 235 240  
 35 Arg Asp Leu Asn Thr Val Ala Val Phe Pro Glu Leu Leu Arg Lys Val  
 245 250 255  
 40 Leu Asn Asp Ile Leu Glu Asp Ile Lys Asp Ser His Pro Ile Gln Asp  
 260 265 270  
 Gly Leu Pro Thr Pro Pro Glu Asp Met Pro Asp Gly Gly Pro Thr Pro  
 275 280 285  
 45 Gly Ala Asn Glu Lys Thr Ser Gln Pro Val Ile His Tyr His Ile Asn  
 290 295 300  
 50 Asn Asp Asn Arg Thr Tyr Asp Asn Arg Val Phe Asp Asn Arg Val Tyr  
 305 310 315 320  
 Asp Asn Ser Tyr His Glu Asn Pro Glu Asn Asp Ala Gln Ser Pro Thr  
 325 330 335  
 55 Ser Gln Thr Asn Asp Leu Leu Ser Arg Asn Gly Asn Ser Leu Leu Asn  
 340 345 350  
 60 Pro Gln Arg Ala Leu Val Gln Lys Val Thr Ser Val Leu Pro His Ser  
 355 360 365

ES 2 646 598 T3

Ile Ser Asp Thr Val Gln Thr Phe Ala Asn Asn Ser Ala Leu Glu Lys  
 370 375 380  
 5  
 Val Phe Asn His Thr Pro Asp Asn Ser Asp Gly Ile Gly Ser Asp Leu  
 385 390 395 400  
 10  
 Leu Thr Thr Ser Ser Gln Glu Arg Ser Ala Asn Asn Ser Leu Ser Arg  
 405 410 415  
 15  
 Gly His Arg Pro Leu Asn Ile Gln Asn Ser Ser Thr Thr Pro Pro Leu  
 420 425 430  
 20  
 His Pro Glu Gly Val Thr Ser Ser Asn Asp Asn Ser Ser Asp Thr Thr  
 435 440 445  
 25  
 Lys Ser Ser Ala Ser Leu Ser His Arg Val Ala Ser Gln Ile Asn Lys  
 450 455 460  
 30  
 Phe Asn Ser Asn Thr Asp Ser Lys Val Leu Gln Thr Asp Phe Leu Ser  
 465 470 475 480  
 35  
 Arg Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Thr Arg Glu Thr Ile Phe Glu Ala Ser  
 485 490 495  
 40  
 Lys Lys Val Thr Asn Ser Leu Ser Asn Leu Ile Ser Leu Ile Gly Thr  
 500 505 510  
 45  
 Lys Ser Gly Thr Gln Glu Arg Glu Leu Gln Glu Lys Ser Lys Asp Ile  
 515 520 525  
 50  
 Thr Lys Ser Thr Thr Glu His Arg Ile Asn Asn Lys Leu Lys Val Thr  
 530 535 540  
 55  
 Asp Ala Asn Ile Arg Asn Tyr Val Thr Glu Thr Asn Ala Asp Thr Ile  
 545 550 555 560  
 60  
 Asp Lys Asn His Ala Ile Tyr Glu Lys Ala Lys Glu Val Ser Ser Ala  
 565 570 575  
 Leu Ser Lys Val Leu Ser Lys Ile Asp Asp Thr Ser Ala Glu Leu Leu  
 580 585 590  
 Thr Asp Asp Ile Ser Asp Leu Lys Asn Asn Asn Asp Ile Thr Ala Glu  
 595 600 605  
 Asn Asn Asn Ile Tyr Lys Ala Ala Lys Asp Val Thr Thr Ser Leu Ser

610

615

620

5 Lys Val Leu Lys Asn Ile Asn Lys Asp  
625 630

10

## Reivindicaciones

1. Un método, que comprende:  
 5 proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia;  
 detectar en la muestra biológica, una presencia o un nivel de un anticuerpo anti-vinculina; y  
 10 determinar una presencia o probable presencia del síndrome de intestino irritable (IBS) si se detecta la presencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es más alto que un nivel del control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es significativamente más alto que un nivel del control establecido, o  
 15 determinar una ausencia o probable ausencia del síndrome de intestino irritable (IBS) si se detecta una ausencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es igual o inferior al nivel del control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina no es significativamente más alto que un nivel del control establecido.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende, además, seleccionar una terapia para el síndrome del intestino irritable (IBS) si se determina la presencia o probable presencia del síndrome de intestino irritable (IBS).
- 20 3. Un método, que comprende:  
 proporcionar una muestra biológica de un sujeto que requiere el diagnóstico de un trastorno de la motilidad gastrointestinal, trastorno de la motilidad de la vejiga o fibromialgia;  
 25 detectar en la muestra biológica, una presencia o un nivel de un anticuerpo anti-vinculina; y  
 determinar una presencia o probable presencia del síndrome de intestino irritable (IBS) si se detecta la presencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es más alto que un nivel del control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es significativamente más alto que un nivel del control establecido, o  
 30 determinar una presencia o probable presencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) si se detecta una ausencia del anticuerpo anti-vinculina, si el nivel del anticuerpo anti-vinculina es igual o inferior al nivel del control establecido, o si el nivel del anticuerpo anti-vinculina no es significativamente más alto que un nivel del control establecido.
4. El método de conformidad con la reivindicación 3, que comprende, además, seleccionar una terapia para el IBS si se diagnostica el IBS, o seleccionar una terapia para la IBD si se diagnostica la IBD.
- 35 5. El método de conformidad con la reivindicación 2 o con la reivindicación 4, en donde la terapia es un curso de terapia antibiótica; un agente neutralizante de anticuerpo anti-vinculina o un agente inhibidor de anticuerpo anti-vinculina; o un agente para cambiar la vinculina de un estado inactivo a un estado activo.
- 40 6. El método de conformidad con la reivindicación 2 y la reivindicación 4, en donde la terapia comprende un agonista de vinculina.
7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde el agonista de vinculina es un péptido activador de vinculina.
- 45 8. El método de conformidad con la reivindicación 2 o con la reivindicación 4, en donde la terapia comprende un activador de vinculina.
9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde el activador de vinculina es talina, f-actina, a-catenina o una combinación de estas.
- 50 10. El método de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo anti-vinculina se detecta mediante el uso de vinculina, sec. con núm. de ident. 1 o un fragmento de esta como sustrato o reactivo para unir el anticuerpo anti-vinculina.
- 55 11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde el anticuerpo anti-vinculina se detecta mediante el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Figura 1

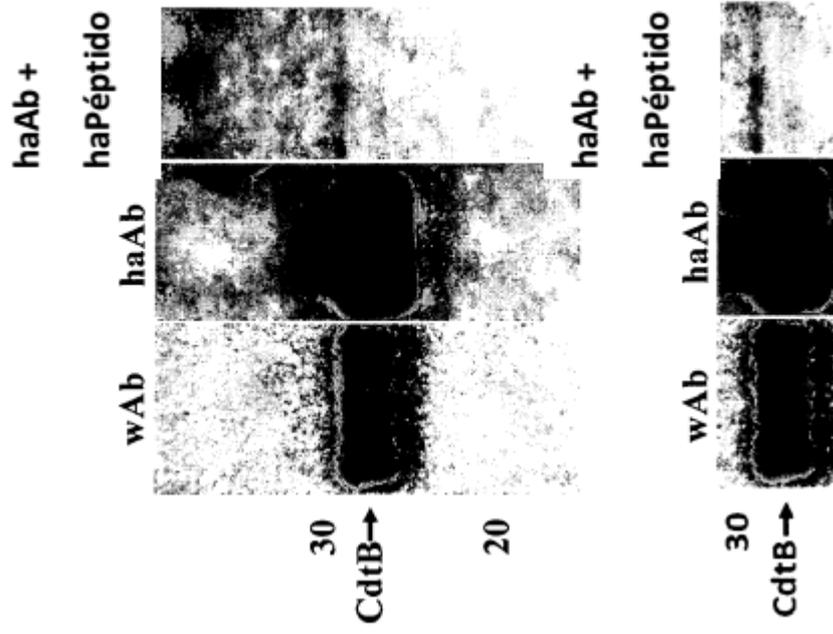
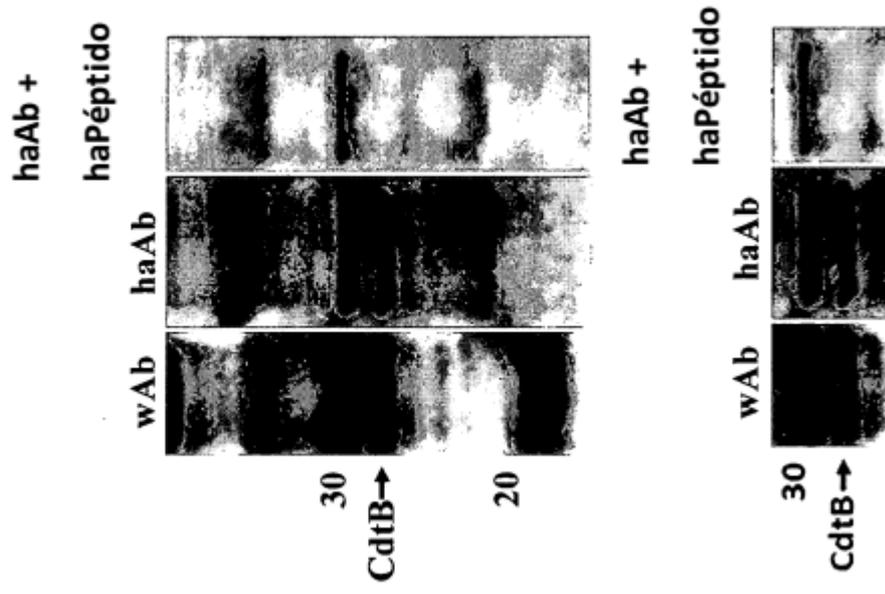
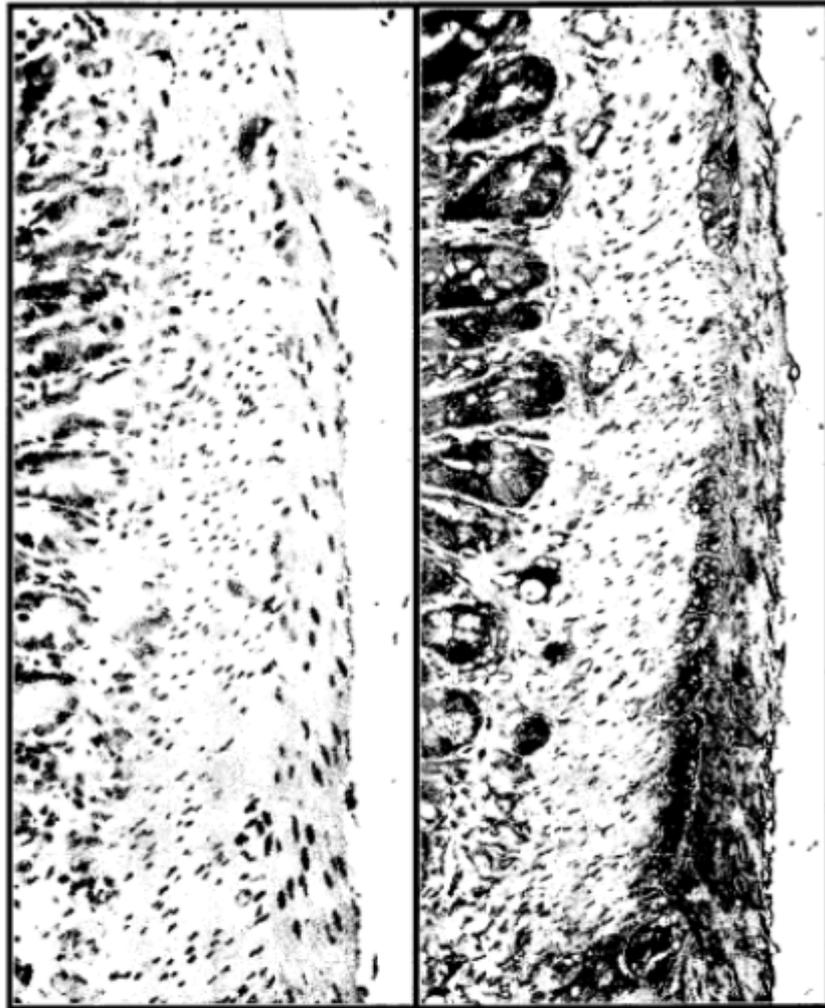


Figura 2





Suero  
preimmune

wAb

Figura 3

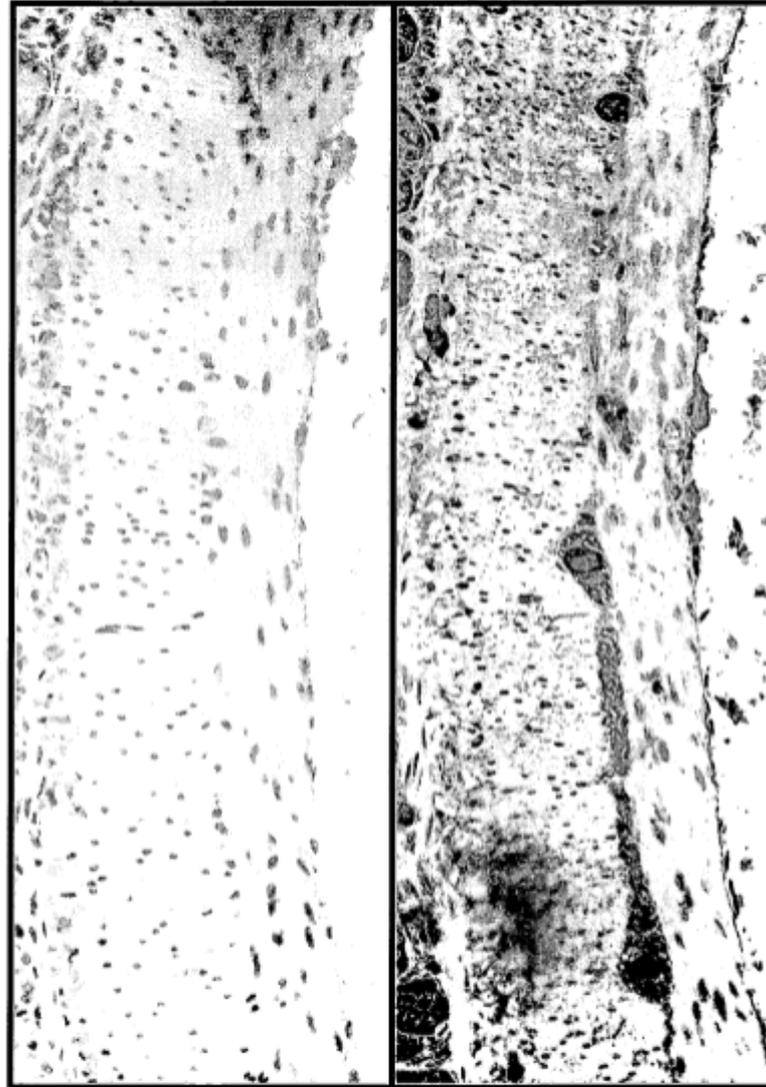
**Figura 4**

**Suero**

**preimmune**

**wAb**





Suero  
preimmune

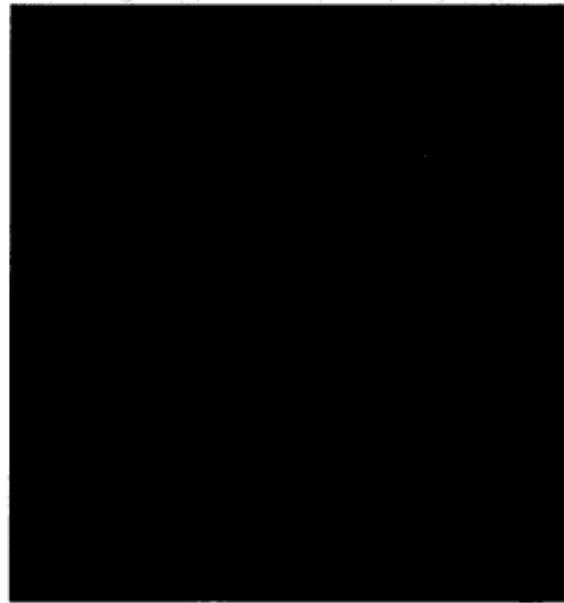
wAb

**Figura 5**

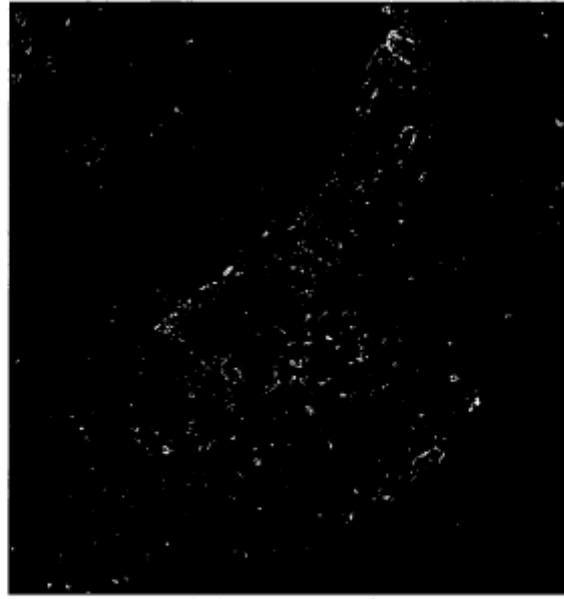
**Figura 6**

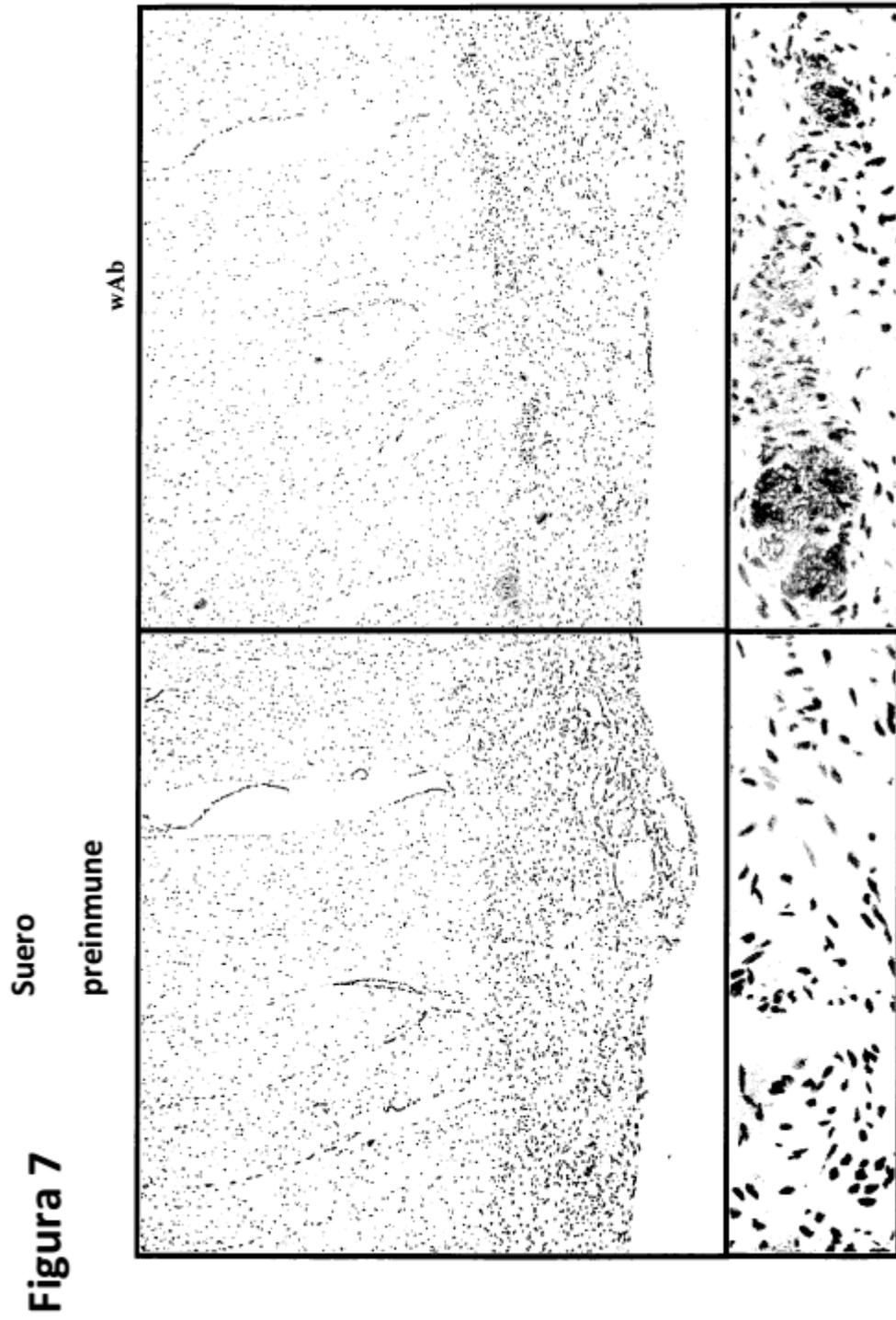
Suero

preimmune

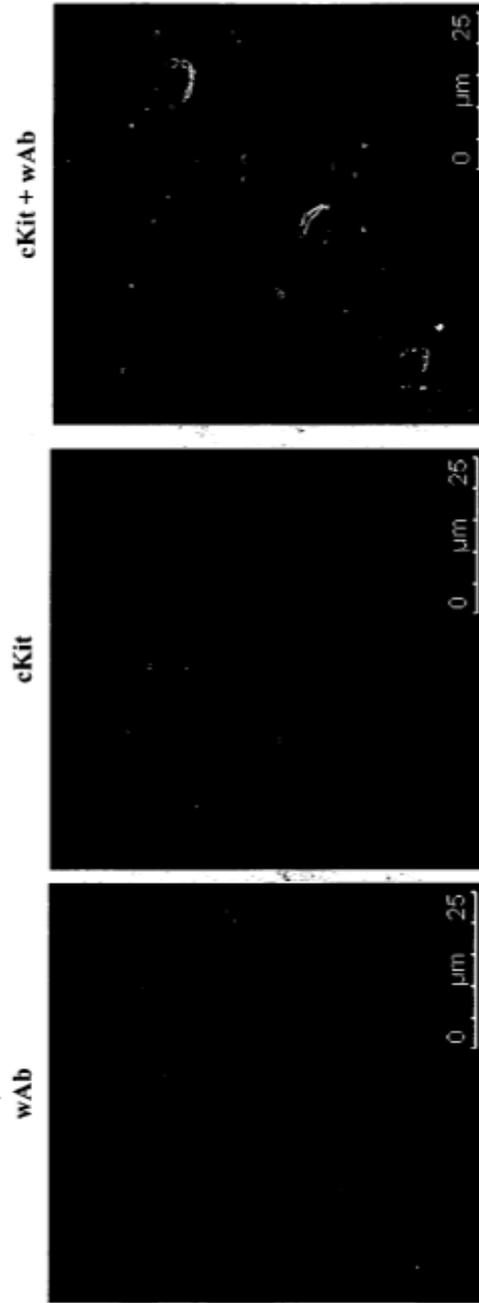


wAb





**Figura 8**



**Figura 9**



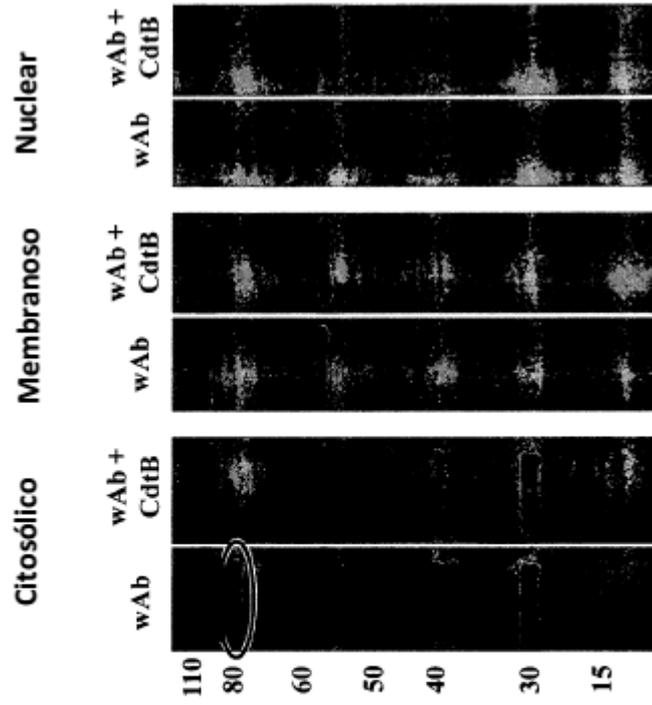
**Figura 10**



**Figura 11**



Figura 12



**Figura 13**



**Figura 14**

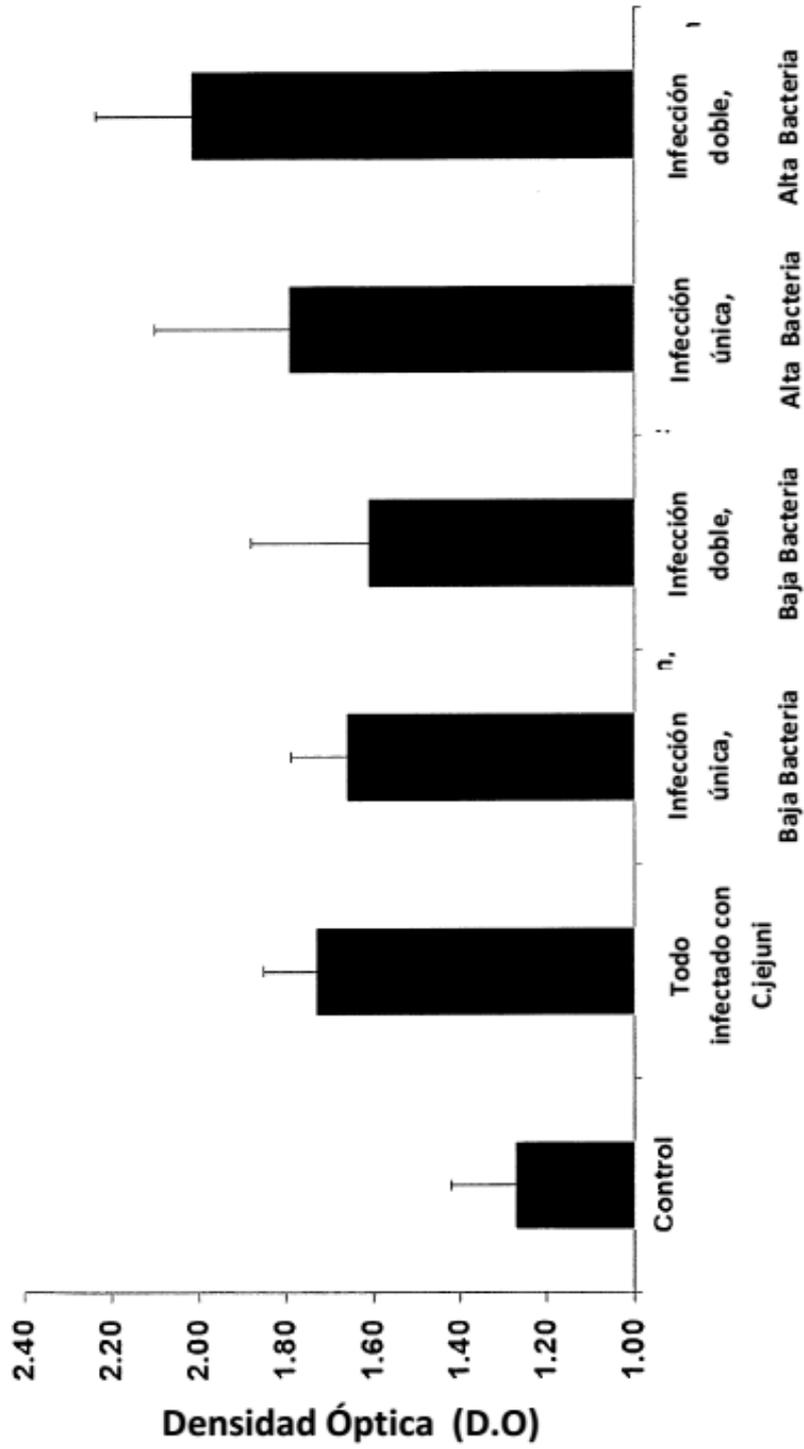


Figura 15

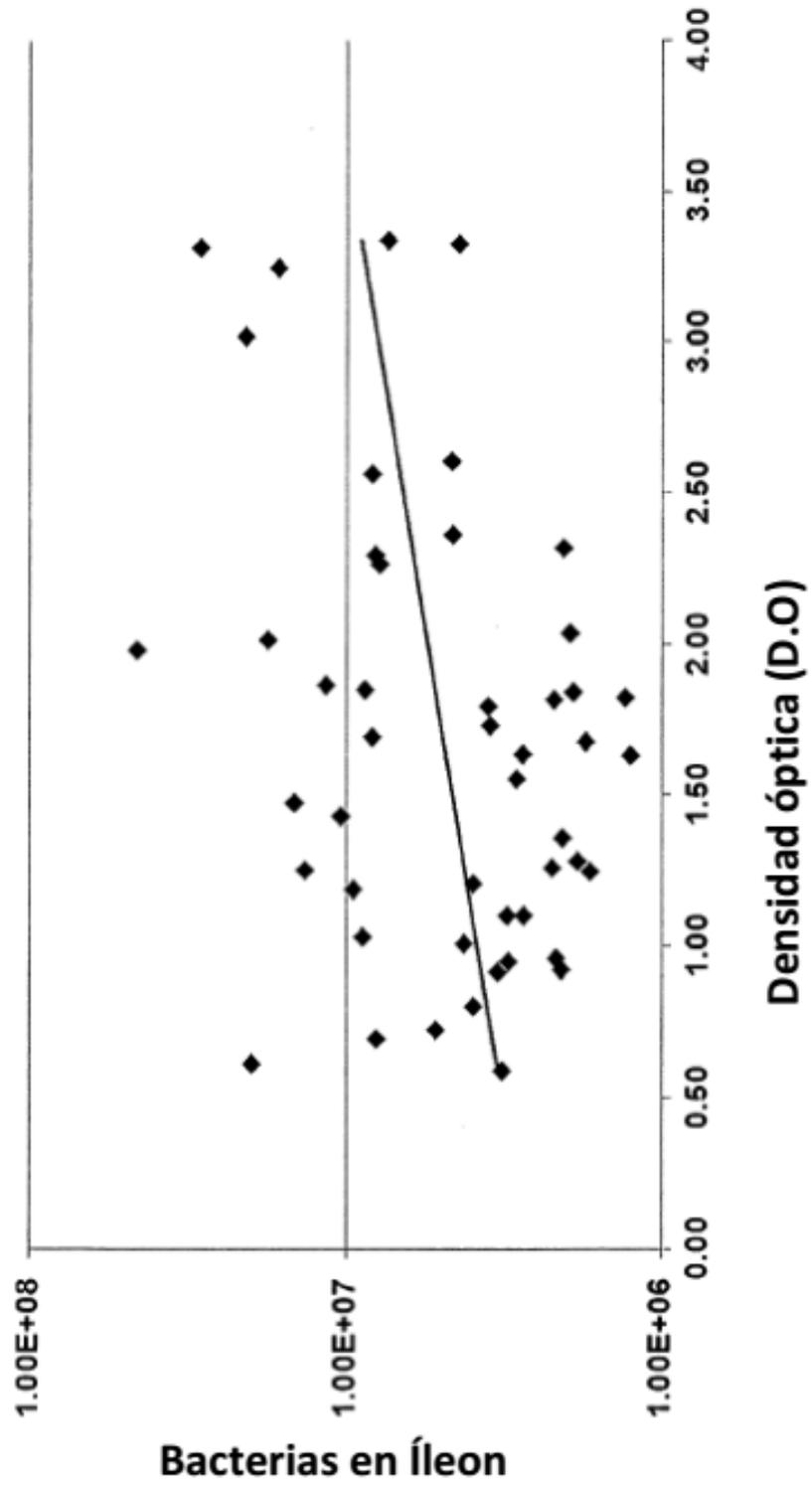


Figura 16

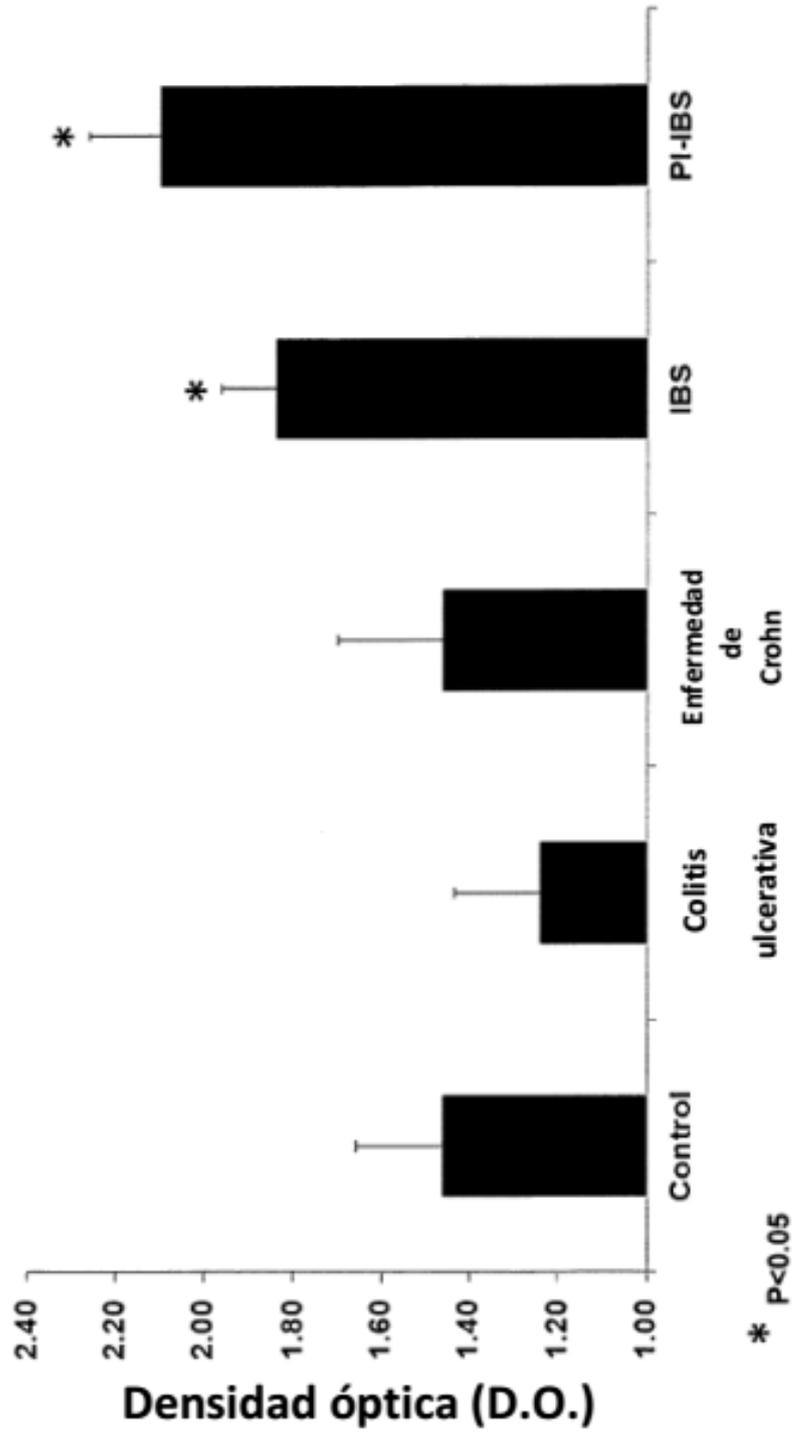


Figura 17

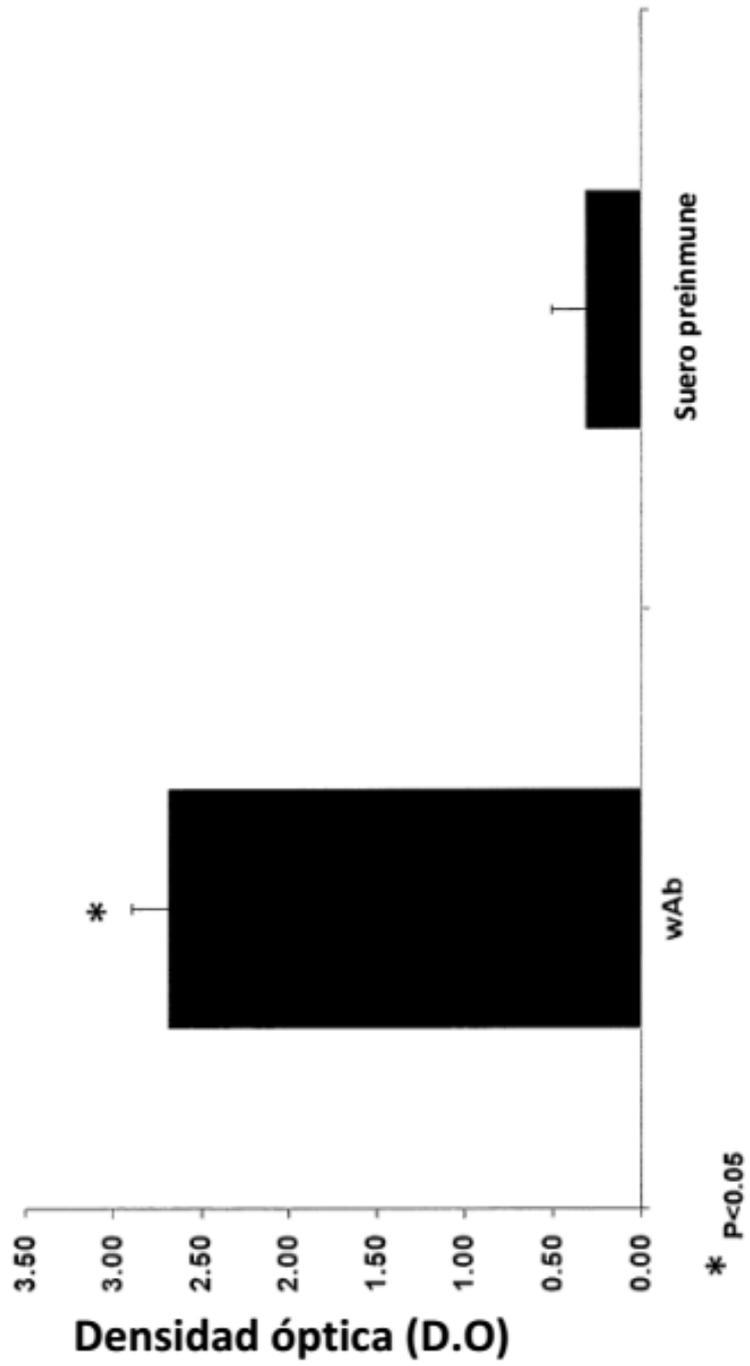
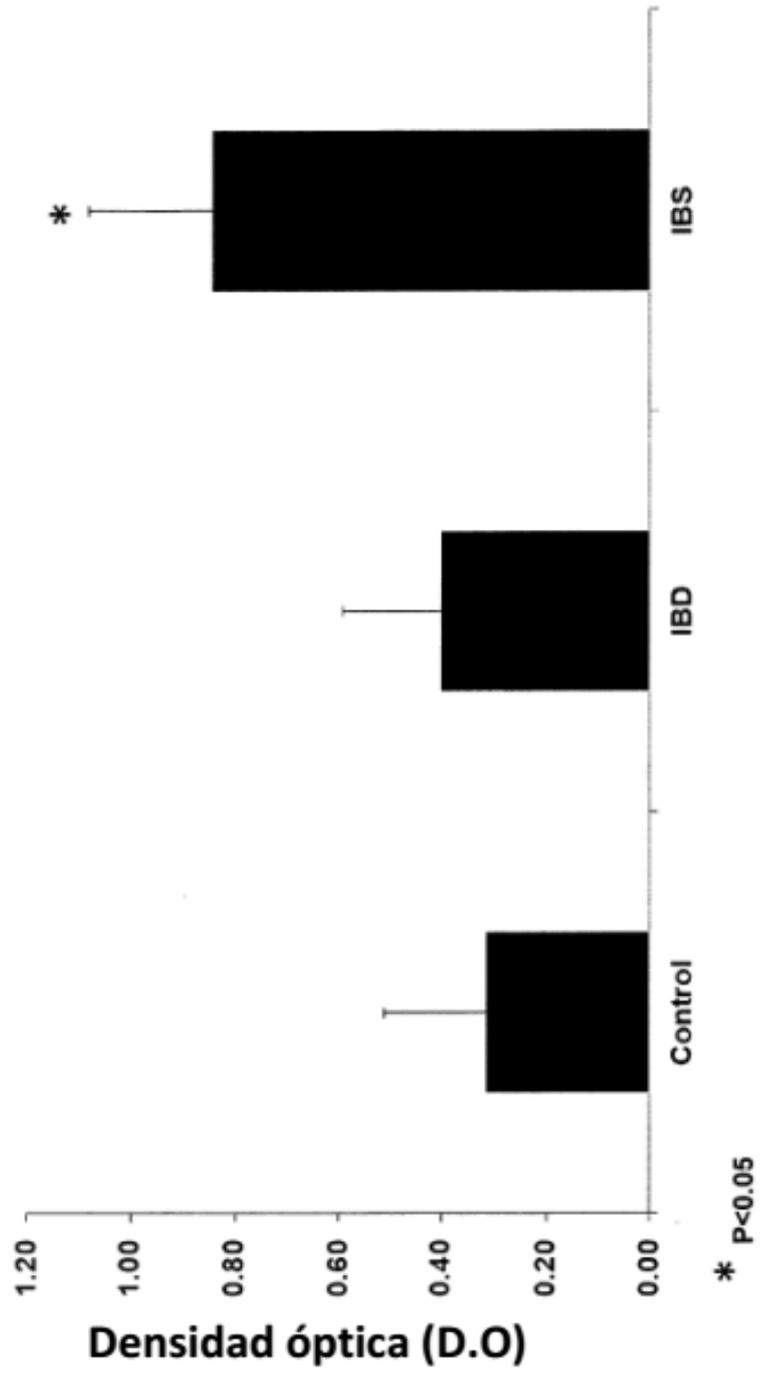


Figura 18



**Figura 19**

