

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 577**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2015** E 15156756 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** EP 2913675

54 Título: **Isoformas de GP2 y su uso en la captura de autoanticuerpos**

30 Prioridad:

28.02.2014 EP 14157199

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

28.10.2020

73 Titular/es:

**GA GENERIC ASSAYS GMBH (100.0%)
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Dahlewitz, DE**

72 Inventor/es:

ROGGENBUCK, DIRK

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 790 577 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

Isoformas de GP2 y su uso en la captura de autoanticuerpos

5 La invención se refiere a un método para unión o captura de autoanticuerpos dirigidos a diversas isoformas de glucoproteína 2 (GP2). En particular, la invención proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos que se unen a una o más isoformas de GP2. La invención se caracteriza por la provisión de múltiples isoformas de GP2 como dianas de autoanticuerpos y abarca la utilización práctica del hallazgo de que la especificidad de isoforma de autoanticuerpos anti-GP2 permite la determinación de enfermedades autoinmunitarias particulares. La invención también proporciona un equipo desarrollado para llevar a cabo el método reivindicado. La presente invención es útil para determinar si una muestra de un individuo comprende autoanticuerpos asociados con una enfermedad autoinmunitaria y para diferenciar entre múltiples enfermedades autoinmunitarias que presentan síntomas similares.

15 **Antecedentes de la invención**

GP2 es una glucoproteína de membrana de las células acinares del páncreas [1]. GP2 se ha detectado en las células de borde en cepillo del intestino y como componente de los lisosomas o como péptido libre, no unido a membrana, en jugo pancreático. Componiendo de 30 a 45 % de la proteína de membrana general, representa el componente principal de la membrana granular de zimógeno. Junto con otras proteínas pancreáticas secretoras de los gránulos zimógenos, tales como sincolina, lectina ZG16p, sinaptobrevina 2 y otros proteoglicanos de matriz de sulfato, GP2 es un componente de las balsas lipídicas de la membrana granular y la sincolina interactúa con GP2. Estos complejos, incluyendo también otras proteínas tales como ZG46p, forman la matriz submembranosa.

25 La glucoproteína 2 (GP2) se ha identificado como la principal diana autoantigénica de anticuerpos pancreáticos (PAB) específicos de la enfermedad de Crohn (EC) [2,3]. Además de su ubicación restringida previamente supuesta en el páncreas, datos recientes han demostrado que GP2 también es un constituyente de las células microplegadas (M) del epitelio asociado al folículo, que parece tener un efecto antimicrobiano, como su homólogo renal, uromodulina (proteína Tamm-Horsfall) [4,5]. Adicionalmente, las pruebas emergentes indican que GP2 se sobreexpresa en el sitio de inflamación intestinal en pacientes con EC y que esta molécula modula las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas [2,6,7]

35 Tanto la EC como la enfermedad celíaca (ECe) demuestran inflamación del intestino. Sin embargo, la localización de la destrucción intestinal y los mecanismos fisiopatológicos responsables de la inducción de estas enfermedades son muy distintos [8,9]. No obstante, se cree que los procesos inflamatorios observados en EC y ECe se agravan por o conducen a un deterioro de la barrera intestinal [10,11]. Se han recopilado cada vez más pruebas que demuestran que ambas entidades clínicas implican la pérdida de tolerancia humoral a los antígenos propios y de la microbiota [12-15]. Se ha mostrado en la técnica que la pérdida de tolerancia a GP2 es un rasgo característico de la destrucción intestinal en pacientes con EC [16-18].

40 Se ha informado de pérdida de tolerancia a GP2 en hasta 30 % de los pacientes con EC y hasta aproximadamente 8-10 % de los pacientes con colitis ulcerosa (CU), la otra enfermedad inflamatoria intestinal (EII) principal [19-21]. Se ha evaluado la importancia clínica de estos autoanticuerpos y la seropositividad para los anticuerpos anti-GP2 parece identificar a los pacientes con EC con localización ileocolónica, comportamiento estenosante y comienzo temprano de la enfermedad [16,17,22-24].

50 Se han detectado autoanticuerpos patógenos (PAB) relacionados con EC en pacientes con ECe, una enteropatía crónica mediada por el sistema inmunitario del intestino delgado precipitada por exposición al gluten en la dieta en individuos genéticamente predispuestos [25,26]. La exposición al gluten en estos pacientes desencadena procesos inflamatorios que conducen a un grado variable de daño intestinal que es reversible con el inicio de una dieta sin gluten (DSG). Los cambios destructivos de la mucosa detectados en biopsias duodenales y yeyunales conducen a atrofia vellosa con hiperplasia de las criptas, un recuento elevado de linfocitos intraepiteliales y un deterioro de la barrera intestinal, una complicación clínica también observada en pacientes con EII [27,28]. En contraste con los cambios inflamatorios de la mucosa en ECe, la inflamación transmural en la EC abarca todas las capas de la pared intestinal y la adventicia y puede aparecer en todo el tracto intestinal [29]. Pueden desarrollarse lesiones tisulares graves, tales como fisuras, abscesos, estenosis y fístulas en la evolución de la EC.

60 La inmunopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) así como la de la ECe son poco conocidas [30,31]. En ambas afecciones actúan mecanismos de degradación inmunológica impulsados por antígenos, pero aún no está claro si la pérdida de tolerancia a GP2 también se puede observar en un subgrupo de pacientes con ECe. Si está presente esta característica, podría indicar además que se inicia una respuesta anti-GP2 debido al daño de la barrera intestinal y el intestino permeable [32].

65 Se han descrito en 2000 dos variantes de GP2, que se producen en los seres humanos debido al corte y empalme alternativo [33]. Además de la forma grande de GP2, que contiene 527 aminoácidos y denominada alfa, existe una forma beta más corta que comprende solo 380 aminoácidos. La forma beta parece expresarse de manera dominante

en tejido pancreático humano.

En la actualidad, se han descrito cuatro isoformas de GP2 (véanse las tablas 1 a 3 de la descripción detallada de la invención).

5 Aunque, según varios autores, el nivel de GP2 y la gravedad de la EII se correlacionan, el contexto fisiológico es desconocido. Asimismo, la función fisiológica de las cuatro isoformas conocidas de GP2 aún no está clara.

10 Se dice que los péptidos que tienen secuencias muy similares a la isoforma de α -GP2 grande son responsables de la formación de tumores pancreáticos. Se pretende usar anticuerpos contra GP2 como analito y marcador en el diagnóstico del cáncer de páncreas y usar el péptido y su secuencia de ácido nucleico en la terapia inmunológica de enfermedades cancerosas del páncreas (documento WO 01/94409). Los anticuerpos contra la isoforma de β -GP2 pequeña encuentran uso como marcadores de pancreatitis (documento WO 96/17873). Se dice que un aumento de la concentración de β -GP2 es indicativo de la enfermedad.

15 La enfermedad celíaca (o conocida como celiacía o esprúe celíaco) es un trastorno autoinmunitario del intestino delgado que aparece en personas de todas las edades desde la infancia en adelante. Los síntomas incluyen dolor e incomodidad en el tracto digestivo, estreñimiento crónico y diarrea, anemia y astenia, pero estos pueden estar ausentes y se han descrito síntomas en otros sistemas de órganos.

20 El diagnóstico de ECe puede llevarse a cabo a través de múltiples enfoques, aunque ninguno se considera completamente fiable. Los análisis de sangre serológicos son la investigación de primera línea necesaria para realizar un diagnóstico de ECe. Los anticuerpos antiendomisiales del tipo de inmunoglobulina A (IgA) pueden detectar ECe. También se puede aplicar serología para anticuerpos anti-tTG, por lo que los ensayos anti-tTG actuales se basan en una proteína recombinante humana como antígeno.

25 EC y CU representan las dos EII más importantes. Se caracterizan por procesos inflamatorios crónicos, recidivantes, destructores de tejidos en el sistema digestivo. Hasta ahora, la etiología y patogenia de la EC así como de la CU no están claras. Aunque la inflamación en la CU aparece predominantemente en la mucosa y submucosa del colon y el recto, la EC se caracteriza por procesos inflamatorios granulomatosos, que penetran en la pared, del tubo gastrointestinal completo.

35 Las investigaciones histológicas muy complejas y relativamente costosas de biopsias de mucosa constituyen medios habituales en el diagnóstico de la EII (EC/CU). Con este fin, se recogen biopsias especialmente de áreas macroscópicamente evidentes así como no evidentes. Para utilizar eficazmente el potencial del diagnóstico diferencial histopatológico es, sin embargo, necesario recoger biopsias de al menos cinco segmentos anatómicos diferentes de todo el colon, incluyendo el recto, del íleon terminal y el tubo gastrointestinal superior. Dichos análisis requieren mucho tiempo y son invasivos, proporcionando molestias significativas al paciente.

40 Todavía es difícil encontrar enfoques de diagnóstico sencillos para el diagnóstico de ECe, EC y CU. Aunque se han desarrollado algunos ensayos inmunológicos, con frecuencia son necesarios análisis adicionales histológicos o basados en biopsias. Se han descrito autoanticuerpos contra proteínas del citoesqueleto en pacientes con EC confirmados por medio de biopsia. Se han encontrado autoanticuerpos contra citoqueratina 18, actina, vimentina, desmina y tropomiosina, entre otros. Aunque se ha descubierto que los autoanticuerpos de citoqueratina 18 se correlacionan con la actividad de la enfermedad, no han logrado ganar aceptación en el diagnóstico rutinario de la EII, probablemente como resultado de su baja especificidad. Se ha hecho referencia explícita a la identificación necesaria, aún por encontrar, del o los autoantígenos pancreáticos para aclarar el estado de los procesos autoinmunitarios en la patogenia de la EC y respaldar la diferenciación de casos poco claros de EII mediante diagnóstico de laboratorio adecuado.

50 GP2 se ha identificado previamente como un biomarcador para pancreatitis y se han desarrollado anticuerpos dirigidos contra GP2 para consultar los niveles de GP2 en pacientes con EII (documento WO 96/17873 A1). Se han descrito previamente diagnósticos basados en autoanticuerpos que implican GP2 como autoantígeno (documento WO 2008/089756 A2). Se han descrito autoanticuerpos anti-GP2 en algunos pacientes con ECe (Bonaci-Nikolic Branka *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 413 (2012) 822-823). Sin embargo, no se ha desvelado previamente ninguna especificidad de isoforma de los autoanticuerpos y tampoco se ha desvelado, ni es posible desvelar, la diferenciación entre EC y ECe, basándose en los métodos desvelados en la técnica.

60 A pesar de los diversos ensayos disponibles para diagnóstico de EC, CU o ECe, todavía existe una incertidumbre significativa sobre qué enfoque es ideal.

65 Asimismo, debido al solapamiento de síntomas entre cada una de estas enfermedades, la mayoría de los ensayos moleculares e histológicos todavía se consideran subóptimos, si no completamente incapaces de distinguir entre trastornos autoinmunitarios separados del tubo gastrointestinal. Por ejemplo, el documento WO 2011/130546 A1 describe un método para distinguir la EC de otras afecciones autoinmunitarias basándose en una puntuación compuesta de anticuerpos microbianos, que requiere un análisis complejo para permitir la identificación de las

afecciones. Son necesarios medios de diagnóstico molecular eficaces y sencillos que proporcionen de manera eficaz diferenciación entre cada una de las afecciones mediante ensayos inmunológicos.

Sumario de la invención

5 Por lo tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de colangitis esclerosante primaria mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende

- 10 - proporcionar una muestra de un sujeto que presenta síntomas y/o se sospecha que tiene colangitis esclerosante primaria,
- 15 - proporcionar dos o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), en donde se proporcionan al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4, en donde las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y 4 son según las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4, respectivamente, o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4,
- 20 - poner en contacto dicha muestra con dichas isoformas de GP2 y
- 25 - detectar autoanticuerpos de dicha muestra que se unen con dichas una o más isoformas
- en donde las etapas de contacto y detección comprenden: permitir que los autoanticuerpos en dicha muestra se unan con más de una de dichas isoformas de GP2, formando de este modo un complejo (complejo GP2-autoanticuerpo), poner en contacto dicho complejo con un marcador para formar un complejo marcado; y detectar la presencia o ausencia del complejo marcado para dichas isoformas de GP2 y asociar la presencia de los autoanticuerpos detectados en la muestra con la presencia de colangitis esclerosante primaria.

30 La invención se refiere al hallazgo sorprendente e inesperado de que diferentes isoformas de la proteína GP2 son dianas de autoanticuerpos que están asociados con diferentes enfermedades autoinmunitarias.

35 Las diversas isoformas de GP2, preferentemente según las secuencias descritas en el presente documento, pueden usarse, por lo tanto, en el diagnóstico y/o la diferenciación de enfermedades autoinmunitarias, en particular trastornos autoinmunitarios asociados con autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo digestivo o intestinal (gastrointestinal) de dicho sujeto.

40 Según la presente invención, los componentes del tubo gastrointestinal, con los que se pueden unir autoanticuerpos, incluyen, pero sin limitación, la mucosa del intestino delgado u otro tejido del intestino delgado, la matriz extracelular vellosa, células epiteliales intestinales, en particular células epiteliales vellosas, el endomisio u otros tejidos o células del estómago, intestino delgado y colon, en particular las células que revisten el estómago, intestino delgado y colon.

45 En el momento de la invención, se desconocía completamente que las diversas isoformas de GP2 pudieran usarse como epítipo o diana para distinguir entre la presencia o ausencia de diferentes enfermedades autoinmunitarias, preferentemente las caracterizadas por autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo gastrointestinal de un sujeto.

50 De este modo, el método permite la diferenciación entre dichas enfermedades en función de sus distintos perfiles de autoanticuerpos, que se dirigen solo a un subconjunto de las isoformas de GP2 proporcionadas en el presente documento. El uso de múltiples isoformas de GP2 representa, de este modo, un concepto novedoso e inventivo a la luz de la técnica anterior con respecto al diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias usando GP2 como diana.

55 El uso de múltiples isoformas de GP2 como dianas de autoanticuerpos en diagnóstico es común a realizaciones preferidas de la invención, representando de este modo un concepto unificador que es novedoso e inesperado a la luz de la técnica citada.

Según la invención, las isoformas se seleccionan de proteínas que comprenden o consisten en:

- 60 - secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y/o 4 de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4, respectivamente, o
- secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4.

65 Las isoformas de GP2 también se refieren a las que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las enumeradas de manera explícita. Esto se refiere a una o más secuencias de aminoácidos que son similares, pero no idénticas, a la secuencia de aminoácidos proporcionada de manera explícita en el presente documento.

La presente invención también abarca variación de la longitud de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos codificantes como se describe en el presente documento. Una persona experta es capaz de proporcionar variantes de secuencias de aminoácidos artificiales que son más largas o más cortas que las secuencias específicas de las SEQ ID NO 1 a 4, que aún presentarán suficiente similitud con las formas naturales para proporcionar los resultados de diagnóstico descritos en el presente documento. Por ejemplo, variantes más cortas de las isoformas más largas (SEQ ID NO 1 o 2) que comprenden 10, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos menos que la forma de longitud completa también pueden permitir resultados de diagnóstico eficaces, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, variantes más largas de las isoformas más cortas (SEQ ID NO 3 o 4) que comprenden 10, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de secuencia de GP2 más que la forma de longitud natural también pueden permitir resultados de diagnóstico eficaces, como se describe en el presente documento.

También se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad celíaca (ECe), en donde la presencia de autoanticuerpos IgG y/o IgA de una muestra de dicho sujeto que se unen con las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) indica la presencia de ECe. Este efecto es preferentemente específico para las isoformas 1 y 2. La provisión de al menos dos isoformas, al menos una de 3 y/o 4 y al menos una de 1 y/o 2, permite un diagnóstico de ECe más sólido del que era posible anteriormente. Por lo tanto, esta realización también se caracteriza por los hallazgos inesperados relacionados con la especificidad de isoforma de los autoanticuerpos anti-GP2.

Se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad celíaca (ECe), en donde una cantidad aumentada o mayor de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) en comparación con los autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en una muestra de un sujeto indica la presencia de ECe en dicho sujeto.

También se desvela en el presente documento un método que comprende:

- medir una cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y una cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en la muestra;
- comparar la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) con la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), en donde, cuando la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) es mayor que la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), al sujeto se le diagnostica enfermedad celíaca.

Se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC), en donde la presencia de autoanticuerpos IgG y/o IgA de una muestra de dicho sujeto que se unen a las isoformas 1, 2, 3 y/o 4 de GP2 (SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4), preferentemente isoformas 2, 3 y/o 4 (SEQ ID NO 2, 3 y/o 4), más preferentemente isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), indica la presencia de EC.

Se ha mostrado por primera vez que los autoanticuerpos en pacientes con EC que se unen a GP2 se unen a las formas relativamente más cortas de GP2, concretamente, las isoformas 3 y/o 4. Por lo tanto, esta realización se caracteriza por los hallazgos inesperados relacionados con la especificidad de isoforma de los autoanticuerpos anti-GP2.

También se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC), en donde una cantidad aumentada o mayor de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 de GP2 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en comparación con los autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) en una muestra de dicho sujeto indica la presencia de EC en dicho sujeto.

También se desvela en el presente documento un método que comprende:

- medir una cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y una cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en la muestra;
- comparar la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) con la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), en donde, cuando la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 de GP2 es mayor que la cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2, al sujeto se le diagnostica enfermedad de Crohn.

El método también se refiere a un método como se describe esencialmente en el presente documento, por el que dicho método puede describirse como un método *in vitro* para la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende una o más de las características descritas

en el presente documento.

La provisión de la muestra para analizar puede referirse a obtener una muestra de un paciente o a proporcionar una muestra preparada previamente que ya se ha obtenido, preferentemente de un paciente que presenta síntomas y/o se sospecha que tiene un trastorno autoinmunitario, preferentemente un trastorno autoinmunitario asociado con autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo digestivo o intestinal de dicho sujeto.

Se proporcionan en el presente documento ejemplos de los síntomas de dichos trastornos y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Dichos síntomas son bien conocidos por los facultativos expertos en el campo. Cualquier referencia a la provisión de múltiples isoformas comprende la provisión de más de una isoforma para análisis. Las múltiples isoformas se pueden usar en el método como se ha descrito simultáneamente, de manera sucesiva, también en diferentes puntos temporales durante diversos procedimientos de diagnóstico, por ejemplo, con minutos, horas, semanas o meses de diferencia. En algunas realizaciones de la invención, se puede usar una isoforma sola, por ejemplo, en análisis de seguimiento para confirmación. El uso de múltiples isoformas se refiere preferentemente al uso simultáneo de múltiples isoformas, por ejemplo, cuando las isoformas se unen con una sola fase sólida para análisis con una sola muestra, o en fases sólidas separadas para análisis de una sola muestra al mismo tiempo (en otras palabras, en las mismas condiciones).

La muestra de la presente invención se refiere preferentemente a una muestra obtenida de un paciente, tal como un líquido corporal, preferentemente una muestra de sangre, plasma o suero, pero también se puede referir a muestra de heces. También se pueden usar muestras tisulares en el método de la invención. No se pretende que ningún procesamiento particular de la muestra sea limitante del alcance de la invención, esencialmente se puede usar cualquier muestra obtenida del paciente, con o sin etapas de procesamiento adicionales antes de la administración en el método descrito en el presente documento.

El contacto de una muestra con las isoformas de GP2 puede tener lugar en cualquier entorno dado. En una realización, se usa una fase sólida, a la que se unen las isoformas. La muestra se proporciona preferentemente como una muestra líquida y se pone en contacto con las isoformas de GP2, permitiendo de este modo que los autoanticuerpos de la muestra interactúen con las isoformas de GP2 en condiciones que permitan la unión de dichos anticuerpos con el epítipo de GP2. Dichas condiciones son conocidas por una persona experta y pueden representar condiciones biológicas, en las que las proteínas relevantes son capaces de formar sus estructuras nativas o casi nativas, para permitir que las propiedades de unión de los anticuerpos habiliten la interacción con dichas isoformas.

Las etapas de contacto y detección pueden llevarse a cabo en realizaciones adicionales de la siguiente manera: permitir que el anticuerpo se una a las una o más isoformas de GP2, formando de este modo un complejo (complejo GP2-autoanticuerpo), poner en contacto el complejo con un marcador, tal como un anticuerpo indicador marcado, preferentemente un anticuerpo que se une a inmunoglobulina humana, para formar un complejo marcado; y detectar la presencia o ausencia del complejo marcado y asociar preferentemente la presencia de los anticuerpos detectados en la muestra con la enfermedad autoinmunitaria.

La detección de anticuerpos unidos puede llevarse a cabo de cualquier manera adecuada dada, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico, un contador de radiación para detectar radiación, tal como un contador gamma para la detección de 1251 o un fluorímetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una longitud de onda determinada.

Puede llevarse a cabo lavado de los anticuerpos unidos como se conoce habitualmente en la técnica, por ejemplo, como se lleva a cabo en un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo ELISA. Se describen en el presente documento medios de detección adicionales.

En el momento de la invención, se desconocía completamente que las diversas isoformas de GP2 pudieran usarse como epítipo o diana para distinguir entre la presencia o ausencia de diferentes enfermedades autoinmunitarias, preferentemente las caracterizadas por autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo gastrointestinal de un sujeto. El método permite la diferenciación entre dichas enfermedades en función de sus distintos perfiles de autoanticuerpos, que se dirigen solo a un subconjunto de las isoformas de GP2 proporcionadas en el presente documento. El uso de múltiples isoformas de GP2 representa, de este modo, un concepto novedoso e inventivo a la luz de la técnica anterior con respecto al diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias usando GP2 como diana.

El método permite de este modo la diferenciación de enfermedades autoinmunitarias, que pueden mostrar síntomas de enfermedad muy similares con respecto a problemas digestivos, cólicos y dolor, diarrea, entre otros, a través de un inmunoensayo sencillo y rentable, tal como un ELISA, evitando de este modo procedimientos de diagnóstico más complicados, tales como endoscopias o análisis de biopsias.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que dicho método proporciona diferenciación de un trastorno autoinmunitario, caracterizado por autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo gastrointestinal de dicho sujeto, de uno o más trastornos autoinmunitarios adicionales también caracterizados por autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo gastrointestinal de dicho sujeto.

En una realización, el método de la presente invención se caracteriza por que dicho trastorno está asociado con autoanticuerpos que se unen a una o más, pero no todas, de las isoformas 1 a 4 de GP2 según las SEQ ID NO 1 a 4. Como se demuestra en los ejemplos experimentales del presente documento, en algunas realizaciones de la invención, las poblaciones de autoanticuerpos se unen solo a un subconjunto de las isoformas de GP2, en particular, las formas largas o cortas de la proteína GP2, y no ambas. Por ejemplo, los autoanticuerpos de pacientes celíacos se unen solo a las isoformas 1 y 2.

Se desvela en el presente documento que los autoanticuerpos anti-GP2 de pacientes con ECe se unen exclusivamente a las isoformas 1 y/o 2 de GP2, por lo que la población de autoanticuerpos de pacientes con EC se unen preferentemente a las isoformas 3 y/o 4. El reconocimiento de este hecho habilita el método como se describe en el presente documento con respecto a la diferenciación entre EC y CU, en particular debido a la identificación de autoanticuerpos que se unen a las isoformas 3 y/o 4, preferentemente 4, lo que indica la presencia de EC, y preferentemente la ausencia de ECe y/o CU.

Se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de enfermedad celíaca (ECe) y la diferenciación de la enfermedad de Crohn (EC), en donde una mayor cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 de GP2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) en comparación con los autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en una muestra de dicho sujeto indica la presencia de ECe y la ausencia de EC en dicho sujeto.

También se desvela un método para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC) y la diferenciación de la enfermedad celíaca (ECe) y/o la colitis ulcerosa (CU).

Se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC), en donde la presencia de autoanticuerpos IgG y/o IgA de una muestra de dicho sujeto que se unen a las isoformas 3 y/o 4 de GP2 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en un grado relativamente mayor que a las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) indica la presencia de EC.

También se desvela en el presente documento un método para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn (EC) y la diferenciación de la enfermedad celíaca (ECe) y/o la colitis ulcerosa (CU), en donde una mayor cantidad de autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 3 y/o 4 de GP2 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en comparación con los autoanticuerpos IgG y/o IgA que se unen a las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) en una muestra de dicho sujeto indica la presencia de EC y la ausencia de ECe y/o CU en dicho sujeto.

Se desvela en el presente documento un método de diferenciación entre colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), en donde la presencia de autoanticuerpos IgG y/o IgA de una muestra de dicho sujeto que se unen a las isoformas 3 y/o 4 de GP2 (SEQ ID NO 3 y/o 4) en un grado comparativamente mayor que a las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) indica la presencia de EC y preferentemente la ausencia de CU.

También se desvelan métodos que comprenden el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria identificada. Se mencionan posibles tratamientos a continuación.

La invención proporciona además un equipo para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen a una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende dos o más isoformas de GP2, en donde al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4 están presentes, en donde las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y 4 son según las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4, respectivamente, o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4.

También se desvela un equipo para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2) según la reivindicación anterior, que comprende:

- al menos una molécula de ácido nucleico que codifica las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y al menos una molécula de ácido nucleico que codifica las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), tales como las que son según las SEQ ID NO 5 a 8, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia degradada de las mismas, o una secuencia complementaria de la misma, o una secuencia de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con una cualquiera o más de las SEQ ID NO 5 a 8.

Se desvela en el presente documento el uso de las moléculas de ácido nucleico en el método o equipo como se describe en el presente documento, en donde dichas moléculas de ácido nucleico comprenden una secuencia que codifica las isoformas 1, 2, 3 y/o 4 (SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4), tales como las que son según las SEQ ID NO 5 a 8, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia degradada de la misma, o una secuencia complementaria de la misma, o una secuencia de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con una cualquiera o más de las SEQ ID NO 5 a 8.

Como se describe en el presente documento, el hallazgo de que diferentes isoformas de GP2 son dianas de autoanticuerpos que están asociados con enfermedades autoinmunitarias específicas, es un hallazgo sorprendente e inesperado como tal.

5 Por lo tanto, la combinación de múltiples isoformas de GP2 en un formato adecuado para llevar a cabo el presente método está motivada solo por el hallazgo novedoso y sorprendente de la presente invención. Por lo tanto, la combinación de múltiples isoformas de GP2 como tales debe considerarse un descubrimiento inesperado de la técnica. No existe ninguna sugerencia en la bibliografía relevante de que se haya desarrollado la provisión de un equipo que comprenda múltiples isoformas de GP2 para llevar a cabo el presente método.

En una realización preferida, el equipo de la presente invención se caracteriza por que dicho equipo comprende:

- 15 - secuencias de aminoácidos de las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), y
- secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4).

20 En una realización, el equipo de la presente invención se caracteriza por que dicho equipo comprende una fase sólida en la que al menos una secuencia de aminoácidos de las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y al menos una secuencia de aminoácidos de las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4) están inmovilizadas.

25 En una realización, el equipo de la presente invención comprende adicionalmente:

- 30 - uno o más anticuerpos humanos antiinmunoglobulina, en donde dichos anticuerpos humanos anti-inmunoglobulina se unen a autoanticuerpos de los subtipos de IgG, IgA y/o IgM,
- un marcador, capaz de unirse a dicho anticuerpo humano anti-inmunoglobulina o ligado a dicho anticuerpo anti-inmunoglobulina, y
- 35 - un medio para detectar dicho marcador.

También se entiende que las realizaciones descritas en el presente documento en referencia al equipo de la presente invención se refieren a características estructurales de los componentes del método como se describe en el presente documento. Por lo tanto, las características del equipo como se describe en el presente documento también pueden usarse para caracterizar el método, y viceversa.

40 Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de un equipo como se describe en el presente documento para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se une con al menos una secuencia de aminoácidos de las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) o al menos una secuencia de aminoácidos de las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4).

45 La invención se refiere además a un sistema para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se une con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende una o más isoformas de GP2, que comprende dos o más isoformas de GP2, en donde están presentes al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4.

50 En una realización, el sistema comprende: un dispositivo de procesamiento informático opcionalmente en red configurado para realizar instrucciones ejecutables; y un programa informático, el programa informático comprende un módulo de software ejecutado por el dispositivo de procesamiento informático para aplicar un modelo o algoritmo para analizar dichos autoanticuerpos.

55 En una realización, el sistema se caracteriza por que el programa informático comprende además un módulo de software ejecutado por el dispositivo de procesamiento informático para designar un régimen de tratamiento para el individuo.

60 En una realización, el sistema se caracteriza por que se identifica que un paciente del que se ha tomado dicha muestra proporciona dicha muestra y, opcionalmente, se trata para la enfermedad autoinmunitaria.

65 El tratamiento para una enfermedad autoinmunitaria del tubo gastrointestinal puede estar relacionado con cualquier tratamiento adecuado conocido por un facultativo médico experto. El tratamiento médico de la EII puede ser individualizado para cada paciente. La elección de qué fármacos usar y por qué vía administrarlos (oral, rectal, inyección, infusión) depende de factores que incluyen el tipo, la distribución y la gravedad de la enfermedad del

paciente, así como otros factores de pronóstico históricos y bioquímicos, y las preferencias del paciente. Por ejemplo, se puede administrar mesalazina. En general, dependiendo del nivel de gravedad, la EII autoinmunitaria puede necesitar inmunosupresión para controlar los síntomas, tal como administración de prednisona, inhibición del TNF, azatioprina (Imuran), metotrexato o 6-mercaptopurina. Con frecuencia, se usan esteroides antiinflamatorios para controlar los brotes de enfermedades. Los pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa pueden recibir inhibidores del TNF. Los casos graves pueden requerir cirugía, tal como resección intestinal o una colostomía o ileostomía temporal o permanente. La cirugía puede curar la colitis ulcerosa si se extrae el intestino grueso. Se puede crear una bolsa a partir del intestino delgado cuando sea necesario, esta actúa como el recto y evita la necesidad de una ileostomía permanente.

Como se desvela en el presente documento, el sistema comprende: (a) un dispositivo de procesamiento informático, opcionalmente conectado a una red informática; y (b) un módulo de software ejecutado por el dispositivo de procesamiento informático para analizar, en una muestra, de un sujeto, una cantidad de autoanticuerpos que se unen a dos o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), en donde el sistema clasifica los autoanticuerpos en grupos, en donde los grupos comprenden autoanticuerpos del grupo 1 que se unen con las isoformas 1 y/o 2 (SEQ ID NO 1 y/o 2) y autoanticuerpos del grupo 2 que se unen con las isoformas 3 y/o 4 (SEQ ID NO 3 y/o 4), y el sistema atribuye la muestra a un trastorno seleccionado de tales como enfermedad celíaca (ECe), enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU), o en un grupo sano en función de la cantidad de autoanticuerpos del grupo 1 o grupo 2 medidos.

También se desvela en el presente documento un sistema que comprende:

- dos o más isoformas de GP2, en donde están presentes al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4,
- un analizador de muestras para determinar la cantidad de autoanticuerpos en una muestra que se unen con isoformas de la glucoproteína 2 (GP2), y
- un sistema informático para recibir y analizar preferentemente de manera automática los datos obtenidos y para correlacionar la cantidad de los autoanticuerpos con un diagnóstico de enfermedad celíaca (ECe), enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU), en donde la cantidad de autoanticuerpos se determina de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Descripción detallada de la invención

Tabla 1: Terminología de las isoformas de GP2

Aminoácidos		Pubmed n.º
537	Isoforma 1 SEQ ID NO.1	NP_001007241.2
534	Isoforma 2 SEQ ID NO.2	NP_001493.2
390	Isoforma 3 SEQ ID NO.3	NP_001007242.2
387	Isoforma 4 SEQ ID NO.4	NP_001007243.2

ES 2 790 577 T3

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de las isoformas 1 a 4

SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos	Descripción
SEQ ID NO 1	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYGNPIEAS SYGLDLDCGAPGTPEAHVCFDPCQNYTLLDEPFRSTENSA GSQGCDKNMSGWYRFVGEVGRMSETCVQVHRCQTDA PMWLNTHPALGDGITHACAHWSGNCCFWKTEVLVKA CPGGYHVYRLEGTPWCNLRVCTVPRDPSTVEDKCEKACR PEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIK VKVDKLLGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEERNWVSVT SPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITLNINFQ CAYPLDMKVSLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQD QNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLVLRN CYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSSES RFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCRSRQ VRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLV AWPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (1) representa la transcripción más larga, aunque aparece con poca frecuencia. Codifica la proteína más larga (isoforma 1).
SEQ ID NO 2	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYGNPIEAS SYGLDLDCGAPGTPEAHVCFDPCQNYTLLDEPFRSTENSA GSQGCDKNMSGWYRFVGEVGRMSETCVQVHRCQTDA PMWLNTHPALGDGITHACAHWSGNCCFWKTEVLVKA CPGGYHVYRLEGTPWCNLRVCTDPTSTVEDKCEKACRPEE ECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKV DKLLGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEERNWVSVTSPV QASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITLNINFQ CAYPLDMKVSLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQDQ NYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLVLRN CYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSSES RFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCRSRQ VRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLV AWPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (2) carece de un segmento alternativo en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 2) es más corta que la isoforma 1. La isoforma 2 también se conoce como la forma alfa.
SEQ ID NO 3	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRVPRDPSTVE DKCEKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQ LDCGPREIKVKVDKLLGGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTE ERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFI IRDITLNINFQ CAYPLDMKVSLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQD QNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLVLRN CYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSSES RFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQPSCRSRQ VRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLV AWPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (3) carece de un segmento alternativo en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 3) tiene un extremo N más corto en comparación con la isoforma 1, aunque se mantienen los 31 aa más N terminales.

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos	Descripción
SEQ ID NO 4	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRDPSTVEDKC EKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDC GPREIKVKVDKLLGGLGLGEEVIAYLRDPNCSSILQTEER NWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRD ILNINFQCAYP LDMKVSLQAALQPIVSSLNVSVDGNGEFIVR MALFQDQNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRF NLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEEN GQSSSRFSVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNEQCQP SCSRSQVRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTP STAGFLVAWPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (4) carece de dos segmentos alternativos en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 4) tiene un extremo N más corto en comparación con la isoforma 1, aunque se mantienen los 31 aa más N terminales. La isoforma 4 también se conoce como la forma beta.

Tabla 3: Secuencias de ADN (tales como ADNc) correspondientes a cada una de las isoformas

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 5	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCTGGCCT CCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATTCTGACCCAGG CATCTGCAGTGCAGCGAGGTTATGGAAACCCATTGAA GCCAGTTCGTATGGGCTGGACCTGGACTGCGGAGCTCC TGGCACCCAGAGGCTCATGTCTGTTTTGACCCCTGTCA GAATTACACCCTCCTGGATGAACCCTTCCGAAGCACAGA GAACTCAGCAGGGTCCCAGGGGTGCGATAAAAACATGA GCGGCTGGTACCGCTTTGTAGGGGAAGGAGGAGTAAGG ATGTCGGAGACCTGTGTCCAGGTGCACCGATGCCAGAC AGACGCTCCCATGTGGCTGAATGGGACCCACCCTGCCC TTGGGGATGGCATCACCAACCACACTGCCTGTGCCATT GGAGTGGCAACTGCTGTTTCTGGAAAACAGAGGTGCTG GTGAAGGCTGCCAGGGCGGGTACCATGTGTACCGGTT GGAAGGCACTCCCTGGTGTAACTCTGAGATACTGCACAGT TCCACGAGACCCATCCACTGTGGAGGACAAGTGTGAGA AGGCCTGCCGCCCCGAGGAGGAGTGCCTTGCCCTCAAC AGCACCTGGGGCTGTTTCTGCAGACAGGACCTCAATAG TTCTGATGTCCACAGTTTGCAGCCTCAGCTAGACTGTGG GCCAGGGAGATCAAGGTGAAGGTGGACAAATGTTTGC TGGGAGGCCTGGGTTTGGGGGAGGAGGTCATTGCCTAC CTGCGAGACCCAACTGCAGCAGCATCTTGCAGACAGA GGAGAGGAACTGGGTATCTGTGACCAGCCCCGTCCAGG CTAGTGCCTGCAGGAACATTCTGGAGAGAAATCAAACCC ATGCCATCTACAAAACACCCTCTCCTTGGTCAATGATTT	Isoforma 1 Base de datos de CCDS CCDS42128.1

ES 2 790 577 T3

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
	CATCATCAGAGACACCATCCTCAACATCAACTTCCAATG TGCCTACCCACTGGACATGAAAGTCAGCCTCCAAGCTG CTTGACAGCCCATTGTAAGTTCCCTGAACGTCAGTGTGG ACGGGAATGGAGAGTTCATTGTCAGGATGGCCCTCTTC CAAGACCAGAACTACACGAATCCTTACGAAGGGGATGC AGTTGAACTGTCTGTTGAGTCCGTGCTGTATGTGGGTGC CATCTTGGAACAAGGGGACACCTCCCGGTTTAACTGGT GTTGAGGAACTGCTATGCCACCCCCACTGAAGACAAGG CTGACCTTGTGAAGTATTTTCATCATCAGAAACAGCTGCT CAAATCAACGTGATTCCACCATCCACGTGGAGGAGAATG GGCAGTCCTCGGAAAGCCGGTTCTCAGTTCAGATGTTCA TGTTTGCTGGACATTATGACCTAGTTTTCTGCATTGTGA GATTCATCTCTGTGATTCTCTTAATGAACAGTGCCAGCCT TCTTGCTCAAGAAGTCAAGTCCGCAGTGAAGTACCGGC CATCGACCTAGCCCGGGTTCTAGATTTGGGGCCCATCA CTCGGAGAGGTGCACAGTCTCCCGGTGTCATGAATGGA ACCCCTAGCACTGCAGGGTTCCTGGTGGCCTGGCCTAT GGTCTCCTGACTGTCCTCCTGGCTTGGCTGTTCTGA	

ES 2 790 577 T3

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 6	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCTGGCCT CCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATTCTGACCCAGG CATCTGCAGTGCAGCGAGGTTATGGAAACCCATTGAA GCCAGTTCGTATGGGCTGGACCTGGA CTGCGGAGCTCC TGGCACCCAGAGGCTCATGTCTGTTTTGACCCCTGTCA GAATTACACCCTCCTGGATGAACCCTTCCGAAGCACAGA GAACTCAGCAGGGTCCCAGGGGTGCGATAAAAACATGA GCGGCTGGTACCGCTTTGTAGGGGAAGGAGGAGTAAGG ATGTCGGAGACCTGTGTCCAGGTGCACCGATGCCAGAC AGACGCTCCCATGTGGCTGAATGGGACCCACCCTGCCC TTGGGGATGGCATCACCAACCACACTGCCTGTGCCATT GGAGTGGCAACTGCTGTTTCTGGAAAACAGAGGTGCTG GTGAAGGCCCTGCCAGGCGGGTACCATGTGTACCGGTT GGAAGGCACTCCCTGGTGTAACTGAGATACTGCACAG ACCCATCCACTGTGGAGGACAAGTGTGAGAAGGCCTGC CGCCCCGAGGAGGAGTGCCTTGCCCTCAACAGCACCTG GGGCTGTTTCTGCAGACAGGACCTCAATAGTTCTGATGT CCACAGTTTGCAGCCTCAGCTAGACTGTGGGCCAGGG AGATCAAGGTGAAGGTGGACAAATGTTTGCTGGGAGGC CTGGGTTTGGGGAGGAGGTCATTGCCTACCTGCGAGA CCCAACTGCAGCAGCATCTTGCAGACAGAGGAGAGGA ACTGGGTATCTGTGACCAGCCCCGTCCAGGCTAGTGCC TGCAGGAACATTCTGGAGAGAAATCAAACCCATGCCATC TACAAAAACACCCTCTCCTTGGTCAATGATTTTCATCATCA GAGACACCATCCTCAACATCAACTTCCAATGTGCCTACC CACTGGACATGAAAGTCAGCCTCCAAGCTGCCTTGCAG CCCATTGTAAGTTCCCTGAACGTCAGTGTGGACGGGAAT GGAGAGTTCATTGTCAGGATGGCCCTCTTCCAAGACCA	Isoforma 2 Base de datos de CCDS CCDS10582.2
	GAACTACACGAATCCTTACGAAGGGGATGCAGTTGAACT GTCTGTTGAGTCCGTGCTGTATGTGGGTGCCATCTTGGG ACAAGGGGACACCTCCCGGTTTAACTGGTGTGAGGA ACTGCTATGCCACCCCACTGAAGACAAGGCTGACCTT GTGAAGTATTTTCATCATCAGAAACAGCTGCTCAAATCAA CGTGATTCCACCATCCACGTGGAGGAGAATGGGCAGTC CTCGGAAAGCCGGTCTCAGTTCAGATGTTTCATGTTTGC TGGACATTATGACCTAGTTTTCTGCATTGTGAGATTCAT CTCTGTGATTCTCTTAATGAACAGTGCCAGCCTTCTTGCT CAAGAAGTCAAGTCCGCAGTGAAGTACCGGCCATCGAC CTAGCCCGGGTCTAGATTTGGGGCCCATCACTCGGAG AGGTGCACAGTCTCCCGGTGTCATGAATGGAACCCCTA GCACTGCAGGGTTCCTGGTGGCCTGGCCTATGGTCCTC CTGACTGTCCCTCGGCTTGGCTGTTCTGA	

ES 2 790 577 T3

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 7	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCTGGCCT CCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATTCTGACCCAGG CATCTGCAGTGCAGCGAGTTCCACGAGACCCATCCACT GTGGAGGACAAGTGTGAGAAGGCCTGCCGCCCCGAGG AGGAGTGCCTTGCCCTCAACAGCACCTGGGGCTGTTTC TGCAGACAGGACCTCAATAGTTCTGATGTCCACAGTTTG CAGCCTCAGCTAGACTGTGGGCCCCAGGGAGATCAAGGT GAAGGTGGACAAATGTTTGCTGGGAGGCCTGGGTTTGG GGGAGGAGGTCATTGCCTACCTGCGAGACCCAACTGC AGCAGCATCTTGCAGACAGAGGAGAGGAACTGGGTATC TGTGACCAGCCCCGTCCAGGCTAGTGCCTGCAGGAACA TTCTGGAGAGAAATCAAACCCATGCCATCTACAAAAACA CCCTCTCCTTGGTCAATGATTTTCATCATCAGAGACACCA TCCTCAACATCAACTTCCAATGTGCCTACCCACTGGACA TGAAAGTCAGCCTCCAAGCTGCCTTGCAGCCCATTGTAA GTTCCCTGAACGTCAGTGTGGACGGGAATGGAGAGTTC ATTGTCAGGATGGCCCTCTTCCAAGACCAGAACTACACG AATCCTTACGAAGGGGATGCAGTTGAACTGTCTGTTGAG TCCGTGCTGTATGTGGGTGCCATCTTGAACAAGGGGA CACCTCCCGGTTTAACTGGTGTGAGGAACTGCTATGC CACCCCACTGAAGACAAGGCTGACCTTGTGAAGTATTT CATCATCAGAAACAGCTGCTCAAATCAACGTGATTCCAC CATCCACGTGGAGGAGAATGGGCAGTCCTCGGAAAGCC GGTTCTCAGTTCAGATGTTTCATGTTTGCTGGACATTATGA CCTAGTTTTCTGCATTGTGAGATTCATCTCTGTGATTCT CTTAATGAACAGTGCCAGCCTTCTTGCTCAAGAAGTCAA GTCCGCAGTGAAGTACCGGCCATCGACCTAGCCCGGGT TCTAGATTTGGGGCCCATCACTCGGAGAGGTGCACAGT CTCCCGGTGTCATGAATGGAACCCCTAGCACTGCAGGG TTCCTGGTGGCCTGGCCTATGGTCCTCCTGACTGTCCTC CTGGCTTGGCTGTTCTGA	Isoforma 3 Base de datos de CCDS CCDS45433.1

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 8	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCTGGCCT CCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATTCTGACCCAGG CATCTGCAGTGCAGCGAGACCCATCCACTGTGGAGGAC AAGTGTGAGAAGGCCTGCCGCCCCGAGGAGGAGTGCC TTGCCCTCAACAGCACCTGGGGCTGTTTCTGCAGACAG GACCTCAATAGTTCTGATGTCCACAGTTTGCAGCCTCAG CTAGACTGTGGGCCAGGGAGATCAAGGTGAAGGTGGA CAAATGTTTGCTGGGAGGCCTGGGTTTGGGGAGGAGG TCATTGCCCTACCTGCGAGACCCAACTGCAGCAGCATCT TGCAGACAGAGGAGAGGAACTGGGTATCTGTGACCAGC CCCGTCCAGGCTAGTGCCTGCAGGAACATTCTGGAGAG AAATCAAACCCATGCCATCTACAAAACACCCTCTCCTT GGTCAATGATTTTCATCATCAGAGACACCATCCTCAACAT CAACTTCCAATGTGCCTACCCACTGGACATGAAAGTCAG CCTCCAAGCTGCCTTGCAGCCCATTGTAAGTTCCCTGAA CGTCAGTGTGGACGGGAATGGAGAGTTCATTGTCAGGA TGGCCCTCTTCCAAGACCAGAACTACACGAATCCTTACG AAGGGGATGCAGTTGAACTGTCTGTTGAGTCCGTGCTGT ATGTGGGTGCCATCTTGAACAAGGGGACACCTCCCGG TTTAACCTGGTGTGAGGAACTGCTATGCCACCCCCACT GAAGACAAGGCTGACCTTGTGAAGTATTTTCATCATCAGA AACAGCTGCTCAAATCAACGTGATTCCACCATCCACGTG GAGGAGAATGGGCAGTCCCTCGGAAAGCCGGTTCTCAGT TCAGATGTTTCATGTTTGCTGGACATTATGACCTAGTTTTC CTGCATTGTGAGATTCATCTCTGTGATTCTTTAATGAAC AGTGCCAGCCTTCTTGCTCAAGAAGTCAAGTCCGCAGTG AAGTACCGGCCATCGACCTAGCCCGGGTTCTAGATTTG GGGCCCATCACTCGGAGAGGTGCACAGTCTCCCGGTGT CATGAATGGAACCCCTAGCACTGCAGGGTTCTGGTGG CCTGGCCTATGGTCTCCTGACTGTCCTCCTGGCTTGG CTGTTCTGA	Isoforma 4 Base de datos de CCDS CCDS45432.1

La referencia CCDS se refiere al proyecto CCDS como se describe en "The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes", Pruitt KD, *et al*, Genome Res. julio de 2009; 19 (7): 1316-23.

- 5 Un autoanticuerpo es un anticuerpo (un tipo de proteína) fabricado por el sistema inmunitario que se dirige contra una o más de las proteínas propias del individuo. Muchas enfermedades autoinmunitarias están asociadas y/o provocadas por dichos autoanticuerpos.
- 10 La expresión "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a cualquier enfermedad dada asociada y/o provocada por la presencia de autoanticuerpos. Las enfermedades autoinmunitarias surgen de una respuesta inmunitaria anómala del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo (autoinmunidad). Esto puede estar restringido a determinados órganos o implicar un tejido particular.
- 15 Una enfermedad autoinmunitaria preferida de la invención es la enfermedad inflamatoria intestinal. La expresión "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" se refiere a trastornos gastrointestinales que incluyen, sin limitación, enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y colitis indeterminada (CI).

- Por lo tanto, una enfermedad autoinmunitaria preferida de la invención es una enfermedad autoinmunitaria del tubo digestivo o intestinal de dicho sujeto. Dichas enfermedades se caracterizan porque el trastorno autoinmunitario presenta autoanticuerpos que se unen a componentes del tubo digestivo o intestinal de dicho sujeto. Dichos componentes del tubo digestivo o intestinal pueden ser cualquier órgano, tejido, célula o proteína hallado en dicha
- 5 área del sujeto. El tubo digestivo o intestinal puede entenderse como el tubo gastrointestinal (tubo GI), que se refiere al estómago y al intestino, y se divide en los tubos gastrointestinales superior e inferior, y puede incluir todas las estructuras desde la boca hasta el ano. El tubo también se puede dividir en intestino proximal, intestino medio e intestino distal, lo que refleja el origen embriológico de cada segmento del tubo.
- 10 Los autoanticuerpos relacionados con el tubo gastrointestinal (GI) pueden evaluarse en enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis autoinmunitaria y enfermedad celíaca. Dichos autoanticuerpos pueden referirse a ANCA (anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos) y/o ASCA. Pueden detectarse ASCA IgA e IgG en sueros de pacientes con enfermedad de Crohn y pueden usarse para diferenciar la enfermedad de Crohn de la CU.
- 15 El término "muestra" incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo. Las muestras adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, heces, lágrimas, cualquier otro líquido corporal, jugos pancreáticos puros o jugos duodenales, muestras tisulares (p. ej., biopsia) y extractos celulares de los mismos (p. ej., extracto de glóbulos rojos). En una realización preferida, la muestra es una
- 20 muestra de suero. El uso de muestras tales como suero, saliva y orina es bien conocida en la técnica (véase, p. ej., Hashida *et al.*, J. Clin. Lab. Anal., 11: 267-86 (1997)). Un experto en la materia apreciará que muestras tales como muestras de suero se pueden diluir antes del análisis.
- 25 El término "individuo", "sujeto" o "paciente" se refiere normalmente a seres humanos, pero también a otros animales, incluyendo, p. ej., otros primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" incluye una secuencia de aminoácidos que es similar, pero no idéntica, a la secuencia de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, es decir, polipéptido, que tiene sustancialmente la misma secuencia de
- 30 aminoácidos que las isoformas de GP2 en las SEQ ID NO 1 a 4 y puede tener una o más modificaciones, tales como adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de las isoformas de GP2, siempre que el polipéptido modificado conserve sustancialmente al menos una actividad biológica de GP2 tal como inmunorreactividad, en particular la reactividad inmunitaria específica para las enfermedades que pueden diagnosticarse según la presente invención. Una modificación particularmente útil de un polipéptido de la presente
- 35 invención, o un fragmento del mismo, es una modificación que confiere, por ejemplo, mayor estabilidad o reactividad. La incorporación de uno o más D-aminoácidos es una modificación útil para aumentar la estabilidad de un polipéptido o fragmento polipeptídico. De manera similar, la supresión o sustitución de restos de lisina puede aumentar la estabilidad al proteger el polipéptido o fragmento polipeptídico contra la degradación.
- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "isoforma de GP2" incluye una proteína que tiene al menos aproximadamente 50 % de identidad de aminoácidos con una o más de las SEQ ID NO 1 a 4. Como ejemplo no limitante, una isoforma de GP2 de la invención puede tener al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una o más de las SEQ ID NO 1 a 4. También se incluyen en el presente documento variantes de ácido nucleico
- 45 de las SEQ ID NO 5 a 8 que codifican una secuencia proteica de las SEQ ID NO 1 a 4, o una secuencia sustancialmente con la misma secuencia de aminoácidos. También se incluye la secuencia de ácido nucleico complementaria, así como una secuencia degradada modificada para usar la naturaleza degradada del código genético, como conoce un experto en la materia.
- 50 Las secuencias de aminoácidos también pueden comprender de 0 a 100, de 2 a 50, de 5 a 20 o, por ejemplo, de 8 a 15, o cualquier valor de 0 a 20, adiciones o supresiones de aminoácidos en el extremo N y/o C de las proteínas. Los extremos también pueden modificarse con secuencias conectoras adicionales, o eliminación de secuencias, siempre que las propiedades de unión a autoanticuerpos y la inmunorreactividad de la proteína se mantengan esencialmente y los autoanticuerpos como se describen en el presente documento se unan de manera análoga con la secuencia
- 55 específica proporcionada.
- Se han desvelado en la técnica anterior diversas formas de preparar péptidos funcionalmente análogos. En la enseñanza de acuerdo con la invención se incluyen péptidos diseñados a partir de los péptidos de la invención usando dichos métodos. Por ejemplo, una forma de generar péptidos funcionalmente análogos se ha descrito en PNAS USA
- 60 1998, 13 de octubre, 9521, 12179-84; documentos WO 99/6293 y/o WO 02/38592; las enseñanzas anteriores se incorporan por la presente en la divulgación de la invención. Es decir, todos los péptidos, fragmentos peptídicos o estructuras que comprenden péptidos generados usando los métodos mencionados anteriormente, a partir de los péptidos de la invención, son péptidos según la invención, siempre que cumplan el objeto de la invención y, en particular, interaccionen con los autoanticuerpos patógenos. Por ejemplo, estos autoanticuerpos pueden ser
- 65 autoanticuerpos agonistas que activan receptores.

Las isoformas de GP2 también se pueden describir como antígenos, ya que reaccionan con un anticuerpo dirigido a dicha proteína isoforma de GP2. Las isoformas de GP2 también pueden denominarse proteínas o dianas. Para su uso en los métodos de la invención, un antígeno de GP2 se puede purificar parcialmente. Un antígeno de GP2 también se puede preparar de forma recombinante expresando una secuencia de ácido nucleico codificante como se describe en el presente documento usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1999)).

El término "diagnóstico" incluye el uso de los dispositivos, métodos y sistemas, de la presente invención para determinar la presencia o ausencia o probabilidad de presencia o ausencia de un trastorno médicamente relevante en un individuo. El término también incluye dispositivos, métodos y sistemas para evaluar el nivel de actividad de la enfermedad en un individuo. En algunas realizaciones, se usan algoritmos estadísticos para diagnosticar una forma leve, moderada, grave o fulminante del trastorno en función de los criterios desarrollados por Truelove *et al.*, *Br. Med. J.*, 12: 1041-1048 (1955). En otras realizaciones, se usan algoritmos estadísticos para diagnosticar una forma de leve a moderada, de moderada a grave o de grave a fulminante de la EII en función de los criterios desarrollados por Hanauer *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 92: 559-566 (1997). Como se desvela en el presente documento, se usa la presencia de anticuerpos contra GP2 para diagnosticar la enfermedad de Crohn. Un experto en la materia conocerá otros métodos para evaluar la gravedad de la EII en un individuo.

El análisis comparativo descrito en el presente documento entre la unión de autoanticuerpos con diferentes isoformas de GP2 es un método preferido de la presente invención. Puede usarse la comparación directa basada en la unión de autoanticuerpos medida en el mismo experimento. Para esta realización, la cantidad de isoforma de GP2 proporcionada para el experimento debería controlarse cuidadosamente para permitir el análisis comparativo directo. Como alternativa, o en combinación, se pueden usar valores o patrones de control que proporcionen muestras con autoanticuerpos o representen cantidades de control de los mismos, como ya se ha obtenido de pruebas analíticas anteriores. Es posible usar valores de control que han sido generados por el análisis de cohortes u otros grandes números de sujetos que padecen cualquier enfermedad dada o grupo de control. Los expertos en la materia conocen medios estadísticos adecuados para el análisis y la comparación de dichos conjuntos de datos. Se pueden usar muestras de control para controles positivos (tales como enfermos) o controles negativos (de sujetos sanos) para valores de referencia en comparación simultánea o no simultánea.

La invención también abarca el uso del método para supervisar enfermedades, también conocido como supervisión de la progresión o remisión de la enfermedad autoinmunitaria. La expresión "supervisión de la progresión o remisión de la enfermedad autoinmunitaria" incluye el uso de los dispositivos, métodos y sistemas de la presente invención para determinar la patología (p. ej., presencia o gravedad de la enfermedad autoinmunitaria) de un individuo. En determinados casos, los resultados de un algoritmo estadístico (p. ej., un sistema clasificador estadístico de aprendizaje) se comparan con los resultados obtenidos para el mismo individuo en un momento anterior. En algunos aspectos, los dispositivos, métodos y sistemas de la presente invención también se pueden usar para predecir la progresión de la enfermedad autoinmunitaria, p. ej., determinando la probabilidad de que la enfermedad autoinmunitaria progrese rápida o lentamente en un individuo en función de la presencia o el nivel de al menos un marcador en una muestra. En otros aspectos, los dispositivos, métodos y sistemas de la presente invención también se pueden usar para predecir la remisión de la enfermedad autoinmunitaria, p. ej., determinando la probabilidad de que la enfermedad autoinmunitaria remita rápida o lentamente en un individuo en función de la presencia o el nivel de al menos un marcador en una muestra. También se puede realizar supervisión de la terapia, por la que se supervisa la progresión de la enfermedad en un sujeto durante el transcurso de cualquier terapia dada.

En determinados casos, la presencia o el nivel de anticuerpos anti-GP2 o al menos un marcador se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Un ejemplo no limitante de un inmunoensayo adecuado para su uso en el método de la presente invención incluye un ELISA. Los ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, ensayos de inmunofluorescencia tales como ensayos de anticuerpos de fluorescencia directa, ensayos de IFA, ensayos de inmunofluorescencia anticomplemento y ensayos de inmunofluorescencia de avidina-biotina. Otros tipos de ensayos inmunohistoquímicos incluyen ensayos de inmunoperoxidasa.

La enfermedad celíaca (ECe) es un trastorno autoinmunitario del intestino delgado que aparece en personas de todas las edades desde la infancia en adelante. Los síntomas incluyen molestias en el tubo digestivo, estreñimiento crónico y diarrea, anemia y astenia, pero estos pueden estar ausentes y se han descrito síntomas en otros sistemas de órganos. La ECe severa conduce a los síntomas característicos de heces pálidas, sueltas y grasientas (esteatorrea) y pérdida de peso o falta de aumento de peso (en niños pequeños). Las personas con enfermedad celíaca más leve pueden presentar síntomas que son mucho más sutiles y aparecen en otros órganos además del intestino. También es posible tener enfermedad celíaca sin ningún síntoma en absoluto. Pueden presentarse dolor abdominal y calambres, hinchazón con distensión abdominal y úlceras en la boca. A medida que el intestino se daña más, se puede desarrollar un grado de intolerancia a la lactosa. Con frecuencia, los síntomas se atribuyen al síndrome del intestino irritable (SII), y solo se reconocen posteriormente como enfermedad celíaca; una pequeña proporción de personas con síntomas de SII tienen enfermedad celíaca subyacente y se recomienda la exploración para detectar la enfermedad celíaca para las personas con síntomas de SII.

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad de inflamación crónica que puede afectar a cualquier parte del tubo gastrointestinal. Habitualmente, la parte distal del intestino delgado, es decir, el ileon y el ciego se ven afectados. En otros casos, la enfermedad se limita al intestino delgado, colon o región anorrectal. La EC afecta ocasionalmente al duodeno y el estómago y con menos frecuencia al esófago y la cavidad oral. Las manifestaciones clínicas variables de la EC son, en parte, resultado de la localización anatómica variable de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes de la EC son dolor abdominal, diarrea y fiebre recurrente. La EC se asocia habitualmente con la obstrucción intestinal o fístula, un pasaje anómalo entre las asas intestinales enfermas.

La enfermedad de Crohn pertenece al grupo de las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas. Es una inflamación granulomatosa crónica, supuestamente autoagresiva, que puede aparecer en todo el tubo gastrointestinal, es decir, desde la cavidad oral hasta el ano. Afecta principalmente al intestino delgado inferior (ileon terminal, con aproximadamente 40 % afectado) y el colon, con menos frecuencia en el esófago y la boca. La enfermedad de Crohn se caracteriza por una afección discontinua, segmentaria (las denominadas "lesiones discontinuas") de la mucosa intestinal, es decir, la enfermedad puede estar presente simultáneamente en una pluralidad de secciones intestinales separadas por secciones sanas. Otras designaciones de la enfermedad son enteritis regional, ileítis terminal, enterocolitis regional y enteritis crónica esclerosante, o la abreviatura EC (enfermedad de Crohn) y la enfermedad autoinmunitaria (enfermedad inflamatoria intestinal) como expresión genérica. En consecuencia, la enfermedad de Crohn en el sentido de la invención es cualquier afección que se caracterice macroscópicamente por los siguientes cambios: Fenómeno de manguera de jardín: estenosis segmentarias provocadas por fibrosis, Fenómeno de adoquines: mucosa inflamada en alternancia con ulceraciones profundas, produciendo de este modo una apariencia de adoquines o tumor conglomerado inflamatorio: diversas secciones intestinales se adhieren entre sí.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad del intestino grueso caracterizada por diarrea crónica con calambres, dolor abdominal, hemorragia rectal, secreciones sueltas de sangre, pus y moco. Las manifestaciones de la CU varían ampliamente. Un patrón de agravamientos y remisiones tipifica la evolución clínica para aproximadamente 70 % de los pacientes con CU, aunque están presentes síntomas continuos sin remisión en algunos pacientes con CU. Las complicaciones locales y sistémicas de la CU incluyen artritis, inflamación de los ojos, tales como uveítis, úlceras cutáneas y enfermedad hepática. Además, la CU, y especialmente la forma extensa, de larga duración, de la enfermedad se asocia con un mayor riesgo de carcinoma de colon.

La pancreatitis en el sentido de la invención es inflamación del páncreas que puede ser aguda o tomar un curso crónico. Se induce habitualmente pancreatitis por la activación de enzimas pancreáticas dentro del órgano. La función de estas enzimas es digerir las proteínas y las grasas de modo que se induzca autodigestión del órgano. La autodigestión da lugar a inflamación del páncreas. En los casos graves, se pueden desarrollar hemorragia, daño tisular grave, infecciones y quistes. Una glándula inflamada puede provocar que las enzimas entren en el torrente sanguíneo, alcanzando de este modo los pulmones, el corazón y los riñones donde pueden surgir más daños. Se desarrolla pancreatitis aguda cuando el páncreas se inflama repentinamente pero después se recupera. Algunos pacientes padecen pancreatitis aguda varias veces, pero se recuperan completamente todas las veces. La pancreatitis aguda aparece repentinamente y puede ser una enfermedad grave, potencialmente mortal que provoca una gran cantidad de complicaciones, pero los pacientes normalmente se recuperan de la pancreatitis aguda. La incidencia es de aproximadamente cinco a diez nuevas enfermedades por cada 100.000 habitantes al año.

Según la invención, las isoformas de GP2 descritas en el presente documento se usan para detectar colangitis esclerosante primaria. También se desvela en el presente documento el uso de las isoformas de GP2 descritas en el presente documento para detectar enfermedades hepáticas o enteritis autoinmunitarias. Lo más sorprendente es que el autoantígeno GP2 es adecuado no solo para la detección específica de la enfermedad autoinmunitaria, sino también para la detección de diversas enfermedades hepáticas.

La colangitis en el sentido de la invención se refiere a la inflamación de los conductos biliares intrahepáticos. Puede ser inducida por diversas causas, incluyendo, entre otras cosas, obstrucción de los conductos biliares por cálculos biliares, estenosis, tumores o infestación por parásitos. Se diferencia en colangitis purulenta aguda, colangitis destructiva no purulenta y colangitis esclerosante crónica.

Las enteritis autoinmunitarias en el sentido de la invención implican cualquier forma de enteritis, especialmente las provocadas por enfermedades inflamatorias intestinales crónicas. Además, las enteritis autoinmunitarias en el sentido de la invención implican las provocadas por patógenos de salmonella, *E. coli*, cólera o tífus, o por hongos, protozoos, sustancias tóxicas, pero también cualquier enteritis basada en alergia o cualquier forma de enteritis actínica, enteritis por *Yersinia* o disentería bacteriana.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una población de moléculas de inmunoglobulina, que puede ser policlonal o monoclonal y de cualquier isotipo, o un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina. Dicho fragmento inmunológicamente activo contiene las regiones variables de cadena pesada y ligera, que componen la parte de la molécula de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. Por ejemplo, un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina conocida en la técnica como Fab, Fab' o F(ab')₂ se incluye dentro del significado del término anticuerpo.

En otra realización ventajosa, el inmunoensayo se usa en la detección de anticuerpos, para lo que se prevé la unión del antígeno de isoforma de GP2 a una fase sólida. Después de la adición de solución de muestra, el anticuerpo del paciente incluido en la misma se une con el antígeno GP2. El anticuerpo que se obtiene, p. ej., del suero o las heces de un paciente y se une a GP2 se detecta posteriormente usando un marcador o reactivo marcado y opcionalmente se cuantifica. Por tanto, según la invención, se efectúa detección de los anticuerpos en este método usando reactivos marcados según la tecnología de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) bien conocida. Por lo tanto, los marcadores según la invención comprenden enzimas que catalizan una reacción química que puede determinarse por medios ópticos, especialmente por medio de sustratos cromógenos, métodos quimioluminiscentes o colorantes fluorescentes. En otra realización preferida, los autoanticuerpos se detectan marcando con sustancias débilmente radioactivas en radioinmunoensayos (RIA) en donde se mide la radioactividad resultante.

Como ejemplos de medios para detectar el marcador en el método de la presente invención, se pueden usar diversas técnicas de inmunoensayo, incluyendo inmunoensayos competitivos y no competitivos, para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra (véase, p. ej., Self *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7: 60-65 (1996)). El término inmunoensayo abarca técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ELISA de captura de antígenos, ELISA de tipo sándwich, ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPPIA); y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, dichos inmunoensayos pueden automatizarse. También se pueden usar inmunoensayos junto con fluorescencia inducida por láser (véase, p. ej., Schmalzing *et al.*, *Electrophoresis*, 18: 2184-2193 (1997); Bao, J. *Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 699: 463-480 (1997)). Los inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas por inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, también son adecuados para su uso en la presente invención (véase, p. ej., Rongen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 204: 105-133 (1997)). Además, los ensayos de nefelometría, en los que la formación de complejos de proteína/anticuerpo da como resultado aumento de la dispersión de la luz que se convierte en una señal de velocidad máxima en función de la concentración del marcador, son adecuados para su uso en la presente invención. Los ensayos de nefelometría están disponibles en el mercado de Beckman Coulter (Brea, Calif.; equipo n.º 449430) y pueden realizarse usando un analizador de nefelómetro Behring (Fink *et al.*, *J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem.*, 27: 261-276 (1989)).

Los inmunoensayos descritos anteriormente son particularmente útiles para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra (y pueden considerarse ejemplos de medios para detectar un marcador), en donde un marcador puede entenderse como un autoanticuerpo dirigido a una isoforma de GP2. Como ejemplo no limitante, un ELISA de neutrófilos fijo es útil para determinar si una muestra es positiva para ANCA o para determinar los niveles de ANCA en una muestra. De manera similar, un ELISA que usa fosfopeptidomano de la pared celular de levadura es útil para determinar si una muestra es positiva para ASCA-IgA y/o ASCA-IgG, o para determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Un ELISA que usa proteína de isoforma de GP2 o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva para anticuerpos anti-GP2 o para determinar los niveles de anticuerpo anti-GP2 en una muestra.

En otra realización preferida del método según la invención, los autoanticuerpos se detectan en un inmunoensayo, preferentemente con acoplamiento directo o indirecto de un reactivo a una sustancia marcadora. Esto permite adaptación flexible del método a los potenciales y requisitos de diferentes laboratorios y sus equipos de diagnóstico de laboratorio. En una realización ventajosa, los anticuerpos específicos de la enfermedad autoinmunitaria se detectan en un inmunoensayo en el que los anticuerpos están presentes disueltos en una fase líquida, preferentemente diluidos en una solución de tampón convencional bien conocida por los expertos en la materia o en un líquido corporal sin diluir. Según la invención, también se puede efectuar detección utilizando muestras de heces.

En otra realización preferida de la invención, las moléculas de GP2 unidas a fase sólida o solubles se usan para unirse a los anticuerpos. En una segunda etapa de reacción, se emplean inmunoglobulinas antihumanas, preferentemente seleccionadas del grupo que comprende anticuerpos IgA antihumano, IgM antihumano y/o IgG antihumano, siendo dichas inmunoglobulinas antihumanas conjugados marcados de manera detectable de dos componentes que pueden conjugarse con cualquier enzima marcadora convencional, especialmente sustratos cromógenos y/o quimioluminiscentes, preferentemente con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina. La ventaja de esta realización radica en el uso de tecnología de ELISA disponible habitualmente en instalaciones de laboratorio de modo que pueda establecerse detección según la invención de manera rentable. En otra realización preferida de la invención, el anticuerpo unido a GP2 reacciona con inmunoglobulinas antihumanas, preferentemente seleccionadas del grupo que comprende anticuerpos IgA antihumano, IgM antihumano y/o IgG antihumano, acoplados de manera detectable a isotiocianato de fluoresceína (FITC). De manera similar al ELISA mencionado anteriormente, la tecnología de FITC representa un sistema que está disponible en muchos lugares y, por lo tanto, permite el establecimiento sin problemas y de bajo coste de la detección de la invención en la rutina de laboratorio.

La unión inmunológica específica del anticuerpo con el marcador de interés se puede detectar directa o indirectamente a través de un marcador. Cualquier medio dado para detectar estos marcadores puede considerarse un medio para detectar el marcador según el método de la invención. Los marcadores directos incluyen marcadores fluorescentes o

luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y similares, unidos con el anticuerpo. Se puede usar un anticuerpo marcado con yodo-125 (125I) para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Un ensayo de quimioluminiscencia que usa un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador es adecuado para detección no radioactiva, sensible, de los niveles de marcador. Un anticuerpo marcado con fluorocromo también es adecuado para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Los ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, Texas red y lisamina. Se pueden obtener en el mercado anticuerpos secundarios ligados a fluorocromos, p. ej., F(ab')₂ de cabra anti-IgG humano-FITC está disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, Calif.).

Las etiquetas indirectas incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β-galactosidasa, ureasa y similares. Se puede usar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Se puede usar un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromógeno fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que produce un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, se puede usar un sistema de detección de β-galactosidasa con el sustrato cromógeno o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), que produce un producto soluble detectable a 410 nm.

Se puede analizar una señal del marcador directo o indirecto, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromógeno; un contador de radiación para detectar radiación tal como un contador gamma para la detección de 125I; o un fluorímetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una longitud de onda determinada. Para la detección de anticuerpos ligados a enzimas, se puede realizar un análisis cuantitativo de la cantidad de niveles de marcadores usando un espectrofotómetro tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención se pueden automatizar o realizar de manera robótica, y la señal de múltiples muestras se puede detectar simultáneamente.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar la enfermedad autoinmunitaria o subtipos clínicos de la misma usando isoformas de GP2. Diversos marcadores de enfermedad inflamatoria intestinal (la enfermedad autoinmunitaria), tales como marcadores bioquímicos, marcadores serológicos, marcadores genéticos u otras características clínicas o ecográficas, son adecuados para su uso y se pueden combinar con algoritmos estadísticos para clasificar una muestra de un individuo como muestra de la enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de marcadores de las enfermedades (un autoanticuerpo dirigido contra las isoformas de GP2 descritas en el presente documento) adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antineutrófilos (p. ej., ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, SAPPa, etc.) o anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (p. ej., ASCA-IgA, ASCA-IgG, ASCA-IgM, etc.) Un experto en la materia conocerá marcadores adicionales adecuados para su uso en los algoritmos estadísticos de la presente invención.

La determinación de los niveles de ANCA y/o la presencia o ausencia de pANCA en una muestra es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo citoplasmático antineutrófilos" o "ANCA" incluye anticuerpos dirigidos a componentes citoplasmáticos y/o nucleares de neutrófilos. La actividad de ANCA se puede dividir en varias categorías amplias según el patrón de tinción de ANCA en neutrófilos: (1) tinción de neutrófilos citoplasmáticos sin resaltado perinuclear (cANCA); (2) tinción perinuclear alrededor del borde exterior del núcleo (pANCA); (3) tinción perinuclear alrededor del borde interior del núcleo (NSNA); y (4) tinción difusa con moteado en todo el neutrófilo (SAPPa). Se pueden determinar los niveles de ANCA en una muestra de un individuo, por ejemplo, usando un inmunoensayo tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con neutrófilos fijados con alcohol.

La determinación de los niveles de ASCA (p. ej., ASCA-IgA y/o ASCA-IgG) en una muestra también es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "inmunoglobulina A anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "ASCA-IgA" incluye anticuerpos del isotipo de inmunoglobulina A que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*. De manera similar, la expresión "inmunoglobulina G anti-*Saccharomyces cerevisiae*" o "ASCA-IgG" incluye anticuerpos del isotipo de inmunoglobulina G que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*. La determinación de si una muestra es positiva para ASCA-IgA o ASCA-IgG se realiza usando un antígeno específico para ASCA. Dicho antígeno puede ser cualquier antígeno o mezcla de antígenos con el que se unan específicamente ASCA-IgA y/o ASCA-IgG. Aunque los anticuerpos ASCA se caracterizaron inicialmente por su capacidad para unirse a *S. cerevisiae*, los expertos en la materia entenderán que se puede obtener un antígeno con el que se une específicamente ASCA de *S. cerevisiae* o de diversas otras fuentes siempre que el antígeno sea capaz de unirse específicamente con anticuerpos ASCA.

La invención también se refiere a moléculas de proteínas y ácidos nucleicos correspondientes a las secuencias descritas en el presente documento, por ejemplo, proteínas o moléculas de ácido nucleico que comprenden o consisten en dichas secuencias.

La determinación de autoanticuerpos para las nuevas isoformas de GP2 o uso de las mismas en un ELISA como antígeno en fase sólida en el diagnóstico serológico de las enfermedades descritas en el presente documento no se

ha considerado ni mencionado en la técnica anterior.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método en donde se detectan enfermedades autoinmunitarias de anticuerpos IgA, IgM y/o IgG humanos.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "isoforma de GP2", "GP2", "antígeno GP2", "molécula GP2", "proteína GP2", "péptido GP2" o "autoantígeno GP2", u otra expresión que haga referencia a GP2 se refiere a las nuevas isoformas de GP2 de las secuencias como se desvelan en el presente documento, o secuencias funcionalmente análogas de las mismas, preferentemente a las isoformas 1, 2, 3 y 4. En una realización preferida del método según la invención, la isoforma de GP2 es de origen humano, animal, recombinante o sintético. GP2 representa un péptido muy conservado de modo que GP2 de cualquier origen pueda usarse provechosamente para detección siempre que la secuencia sea funcionalmente análoga de la secuencia según la invención. Se conserva alta afinidad de unión entre la GP2 como antígeno y los autoanticuerpos.

15 En otra realización preferida de la invención, la GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento está unida a una fase sólida. Se puede efectuar unión de GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento a la fase sólida mediante un espaciador. Todos los compuestos químicos que tienen precondiciones estructurales y funcionales adecuadas para la función espaciadora pueden usarse como espaciadores siempre que no modifiquen el comportamiento de unión de tal manera que la unión del autoanticuerpo contra GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento se vea afectada negativamente.

25 En otra realización preferida de la invención, la molécula comprende un conector o espaciador seleccionado del grupo de ácidos α -aminocarboxílicos, así como homo- y heterooligómeros de los mismos, ácidos α,ω -aminocarboxílicos y homo- o heterooligómeros ramificados de los mismos, otros aminoácidos, así como homo- o heterooligómeros lineales y ramificados; aminooligoalcoxilalquil-aminas; derivados del ácido maleinimidocarboxílico; oligómeros de alquilaminas; derivados de 4-alquilfenilo; derivados de 4-oligoalcoxilfenilo o 4-oligoalcoxilfenoxi; derivados de 4-oligoalquilmercaptofenilo o 4-oligoalquilmercaptofenoxi; derivados de 4-oligoalquilaminofenilo o 4-oligoalquilaminofenoxi; derivados de (oligoalquilbencil)fenilo o 4-(oligoalquilbencil)fenoxi, así como derivados de 4-(oligoalcoxilbencil)fenilo o 4-(oligoalcoxilbencil)fenoxi; derivados de tritilo; derivados de benciloxiarilo o benciloxialquilo; derivados de xanthen-3-iloxialquilo; derivados de ácido (4-alquilfenil)- u ω -(4-alquilfenoxi)alcanoico; derivados de oligoalquilfenoxialquilo u oligoalcoxilfenoxialquilo; derivados de carbamato; aminas; derivados de trialkilsililo o dialquilalcoxisililo; derivados de alquilo o arilo o combinaciones de los mismos.

35 Según la invención, también se prefiere realizar el método de detección descrito anteriormente en una fase sólida, por ejemplo, mediante la conexión de la molécula de GP2 con la fase sólida a través de un conector, en cuyo caso la capacidad de almacenamiento del péptido aumenta provechosamente como resultado del ligamiento sorprendentemente estable del antígeno de GP2 con la fase sólida.

40 En otra realización preferida de la invención, la molécula de GP2 se usa como un autoantígeno unido a fase sólida o soluble para la detección directa o indirecta de autoanticuerpos en heces y/o líquidos corporales, especialmente sangre y/o suero, en cuyo caso, se encontró que el uso de la molécula de GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento era particularmente ventajoso.

45 En otra realización preferida de la invención, las secuencias según la presente solicitud, o los péptidos que pueden generarse a partir de las mismas, están inmovilizadas. De manera más específica, la molécula de GP2 unida a fase sólida de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento está unida a polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos y/o mixtos, preferentemente agarosa, celulosa, gel de sílice, poliamidas y/o alcoholes polivinílicos. En el sentido de la invención, se entiende que la inmovilización implica diversos métodos y técnicas para fijar los péptidos en vehículos específicos, p. ej., según los documentos WO 99/56126 o WO 02/26292. Por ejemplo, la inmovilización puede servir para estabilizar los péptidos de modo que su actividad no se reduzca o modifique de manera adversa por exposición biológica, química o física, especialmente durante el almacenamiento o en uso de un solo lote. La inmovilización de los péptidos permite el uso repetido en condiciones técnicas o clínicas rutinarias; asimismo, una muestra, preferentemente componentes sanguíneos, puede hacerse reaccionar con al menos uno de los péptidos según la invención de manera continua. En particular, esto se puede lograr mediante diversas técnicas de inmovilización, produciéndose la unión de los péptidos con otros péptidos o moléculas o con un vehículo de tal manera que la estructura tridimensional, en particular en el centro activo que media en la interacción con los autoanticuerpos, de las moléculas correspondientes, especialmente de dichos péptidos, no cambiaría. Provechosamente, no hay pérdida de especificidad para los autoanticuerpos de pacientes como resultado de dicha inmovilización. En el sentido de la invención, se pueden usar tres métodos básicos para inmovilización:

(i) Reticulación: en la reticulación, los péptidos se fijan entre sí sin afectar de manera adversa a su actividad. Provechosamente, ya no son solubles como resultado de dicha reticulación.

65 (ii) Unión con un vehículo: la unión con un vehículo se produce mediante adsorción, unión iónica o unión covalente, por ejemplo. Dicha unión también puede tener lugar dentro de células microbianas o liposomas u otras estructuras

membranosas, cerradas o abiertas. Provechosamente, los péptidos no se ven afectados de manera adversa por dicha fijación. Por ejemplo, es posible el uso múltiple o continuo de péptidos unidos a vehículos con ventaja en el diagnóstico clínico o la terapia.

5 (iii) Inclusión: la inclusión en el sentido de la invención se produce especialmente en una membrana semipermeable en forma de geles, fibrillas o fibras. Provechosamente, los péptidos encapsulados están separados de la solución de muestra circundante por una membrana semipermeable de tal manera que todavía es posible la interacción con los autoanticuerpos o fragmentos de los mismos. Están disponibles diversos métodos para la inmovilización, tales como adsorción en un vehículo inorgánico u orgánico inerte o con carga eléctrica. Por ejemplo, dichos vehículos pueden ser geles porosos, óxido de aluminio, bentonita, agarosa, almidón, nailon o poliacrilamida. La inmovilización se produce a través de fuerzas de unión físicas, que implican frecuentemente interacciones hidrófobas y unión iónica. Provechosamente, dichos métodos son fáciles de manejar y tienen poca influencia en la conformación de los péptidos. Provechosamente, la unión se puede mejorar como resultado de las fuerzas de unión electrostáticas entre los grupos con carga de los péptidos y el vehículo, p. ej., usando intercambiadores de iones, en particular Sephadex.

Otro método es la unión covalente con materiales portadores. Además, los vehículos pueden tener grupos reactivos que forman enlaces homopolares con cadenas laterales de aminoácidos. Son grupos adecuados en péptidos los grupos carboxilo, hidroxilo y sulfuro y especialmente los grupos amino terminales de lisinas. Los grupos aromáticos ofrecen la posibilidad de acoplamiento diazo. La superficie de las partículas microscópicas de vidrio poroso se puede activar mediante tratamiento con silanos y posteriormente hacer reaccionar con péptidos. Por ejemplo, los grupos hidroxilo de polímeros naturales se pueden activar con bromocianógeno y posteriormente acoplarse con péptidos. Provechosamente, una gran cantidad de péptidos pueden experimentar unión covalente directa con resinas de poliacrilamida. La inclusión en redes tridimensionales implica la inclusión de los péptidos en geles ionotrópicos u otras estructuras bien conocidas por los expertos en la materia. De manera más específica, los poros de la matriz son de naturaleza tal que los péptidos se conservan, permitiendo la interacción con las moléculas diana. En la reticulación, los péptidos se convierten en agregados poliméricos mediante reticulación con agentes bifuncionales. Dichas estructuras son gelatinosas, fácilmente deformables y, en particular, adecuadas para su uso en diversos reactores. Al añadir otros componentes inactivos tales como gelatina en la reticulación, es posible una mejora ventajosa de las propiedades mecánicas y de unión. En microencapsulación, el volumen de reacción de los péptidos está restringido por medio de membranas. Por ejemplo, se puede llevar a cabo microencapsulación en forma de polimerización interfacial. Debido a la inmovilización durante la microencapsulación, los péptidos se hacen insolubles y, por tanto, reutilizables. En el sentido de la invención, son péptidos inmovilizados todos los péptidos que se encuentran en una condición que permite su reutilización. La restricción de la movilidad y la solubilidad de los péptidos por medios químicos, biológicos o físicos provechosamente reduce el coste del proceso, en particular cuando se eliminan autoanticuerpos de los componentes sanguíneos.

La invención también se refiere a un equipo de diagnóstico para la determinación de enfermedades autoinmunitarias, que comprende una molécula de isoforma de GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento. El equipo de diagnóstico incluye opcionalmente instrucciones acerca de la combinación de los contenidos del equipo y/o la provisión de una formulación para la detección de enfermedades inflamatorias intestinales, en particular enfermedad de Crohn, pancreatitis crónica, enfermedad celíaca y/o colitis ulcerosa. Por ejemplo, la instrucción puede estar en forma de un folleto de instrucciones u otro medio que proporcione al usuario información acerca del tipo de método en donde se van a usar las sustancias mencionadas. Evidentemente, la información no necesariamente tiene que estar en forma de un folleto de instrucciones y la información también se puede transmitir a través de Internet, por ejemplo. Para un paciente, un efecto ventajoso de dicho equipo es, por ejemplo, que, sin dirigirse directamente a un médico, puede determinar el estado real de una enfermedad incluso durante un viaje y, opcionalmente, adaptar la dieta y las actividades en consecuencia.

50 FIGURAS

Sin pretender ser limitante, la invención se explicará ahora con más detalle en referencia a las figuras.

Figuras del ejemplo 1:

55 Fig. 1: Diferencias de aminoácidos (AA) de las 4 isoformas de glucoproteína 2 (V, valina; P, prolina; R, arginina).

60 Fig. 2: Reactividad de IgG a 4 isoformas de GP2 diferentes mediante ELISA en 10 pacientes con enfermedad celíaca *de novo* (A) y 50 donantes de sangre (B). Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como triángulos.

65 Fig. 3: Reactividad de IgA a 4 isoformas de GP2 diferentes mediante ELISA en 10 pacientes con enfermedad celíaca *de novo* (A) y 50 donantes de sangre (B). Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior

menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como rectángulos.

5 Fig. 4: Análisis de la curva de características operativas del receptor de IgG (A) e IgA (B) para 4 isoformas de GP2 diferentes mediante ELISA en 10 pacientes con enfermedad celíaca *de novo* (A) y 50 donantes de sangre (B)

Figuras del ejemplo 2:

10 Fig. 5: Reactividad de IgG a la isoforma 1 de GP2 en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre. Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como triángulos.

15 Fig. 6: Reactividad de IgG a la isoforma 2 de GP2 en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre. Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como triángulos.

20 Fig. 7: Reactividad de IgG a la isoforma 3 de GP2 en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre. Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como triángulos.

25 Fig. 8: Reactividad de IgG a la isoforma 4 de GP2 en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre. Los datos se presentan como densidades ópticas (DO) en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el intervalo intercuartil o mayores que el cuartil superior más 3 veces el intervalo intercuartil, presentados como triángulos.

30 Las referencias en las figuras a EC se refieren a EC.

Fig. 9: Análisis de la curva de características operativas del receptor de IgG (A) e IgA (B) para 4 isoformas de GP2 diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre.

Ejemplos

35 Sin pretender ser limitante, la invención se explicará ahora con más detalle en referencia a un ejemplo.

Los experimentos proporcionados en el presente documento demuestran que los autoanticuerpos dirigidos a las isoformas más largas de GP2 (1 y 2) pueden usarse para el diagnóstico de la enfermedad celíaca *de novo* y se caracterizan por mejores características de rendimiento del ensayo que los autoanticuerpos en comparación con las isoformas más cortas. Se pueden usar autoanticuerpos para las isoformas más cortas de GP2, en particular la isoforma 4, para el diagnóstico diferencial de enfermedades inflamatorias intestinales y muestran una mejor diferenciación de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

45 Materiales:

Expresión de GP2 en células de *Spodoptera frugiperda* 9

50 Para la expresión de las cuatro isoformas de GP2, se emplearon cuatro plásmidos que codifican la secuencia de aminoácidos de las isoformas de GP2 NP_001007241.2 (isoforma 1), NP_001493.2 (isoforma 2), NP_001007242.2 (isoforma 3) y NP_001007243.2 (isoforma 4) (fig. 1, tablas 1-3). Se añadieron un sitio de escisión de trombina (VPRGS) y un marcador de His6 en el extremo C-terminal. El inserto obtenido se ligó en un sitio BamHI y EcoRI de un vector pVL1393 lo que dio como resultado 4 plásmidos (pVL-GP2xtrunc-Trombina-His) y las construcciones se verificaron mediante secuenciación.

55 Para transfección, se diseminaron 106 células Sf9 en medio de cultivo TC-100 (Biochrom, Berlín, Alemania) que contiene FCS al 10 %, glutamina 6 mM, estreptomycin 50 µg/ml y penicilina 50 U/ml, y se incubaron en un matraz de 25 cm² durante al menos dos horas a 28 °C. Para transfección, se prepararon dos soluciones que contenían 2,5 µg de BaculoGold (Virus-DNA, BD Biosciences, San José, CA) y 2,5 µg de ADN de los vectores pVL-GP2xtrunc-Trombina-His y el reactivo de transfección Polyfect (Qiagen, Hilden, Alemania) disueltos en agua destilada, respectivamente. Ambas soluciones se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 20 minutos.

60 El medio de cultivo de Sf9 se reemplazó con TC-100 sin suero y la solución de transfección preparada se añadió al cultivo de Sf9 y se incubó durante una noche a 28 °C, posteriormente. A continuación, el medio se cambió por medio de cultivo. Después de 5 días, se recogió el sobrenadante que contenía el virus recombinante y se usó para infecciones adicionales.

Para la infección de células Sf9 con el ADN de GP2 que contenía Baculovirus, se diseminaron células Sf9 en matraces de 150 cm² con una densidad de 2x10⁶ células/cm². El sobrenadante de un cultivo infectado anterior se añadió en una proporción de 1 a 10 y los cultivos se incubaron en un agitador (100 rpm) a 28 °C durante 3 días. Después de recoger el sobrenadante para la purificación de la isoforma de GP2 secretada, la expresión de GP2 se controló mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferencia de Western usando anticuerpos anti-His y anti-GP2 humana como se describe en otra parte.

Purificación de isoformas de GP2 mediante cromatografía de intercambio iónico y quelato de Ni

Los sobrenadantes recogidos se clarificaron mediante centrifugación y se sometieron a una columna de quelato de Ni (HisTrap, 1 ml, GE Healthcare) controlada por ÄKTA-FPLC (GE Healthcare, Múnich, Alemania) equilibrada con tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 200 mM, imidazol 50 mM, pH 8,0). Para eliminar la proteína no unida, la columna se aclaró posteriormente con 7 ml de tampón de unión. Las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 500 mM en una solución de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,5). Las fracciones se recogieron y se almacenaron con azida de sodio al 0,01 % a 4 °C hasta su purificación posterior.

Para cromatografía de intercambio aniónico, se equilibró una columna Mono Q 5/50 (SGE Healthcare) con fosfato de sodio 20 mM (pH 7,5). Después de la aplicación de la solución que contiene GP2, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de NaCl 1 M en un tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,5). Las fracciones que contenían glucoproteína 2 se agruparon, se dializaron frente a tampón Tris 50 mM (pH 7,5) y se almacenaron con azida sódica al 0,01 % a 4 °C hasta su uso posterior.

Detección de anticuerpos anti-isoforma de GP2 mediante ELISA

Se evaluaron IgG e IgA contra las 4 isoformas de GP2 en muestras de suero de pacientes y controles mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Como dianas antigénicas en fase sólida, estos ensayos emplean las diferentes isoformas de GP2 humanas recombinantes expresadas en células de *Spodoptera frugiperda* 9. En resumen, se aplicaron isoformas de GP2 a una concentración de 5 µg/ml sobre placas de microtitulación Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en tampón de recubrimiento (pH 9,5) a 4 °C. Después de bloquear a TA durante una hora, las muestras de suero diluidas 1 en 100 se incubaron a TA durante una hora y se lavaron. Se añadieron anticuerpos IgG o IgA anti-humanos conjugados con peroxidasa de rábano picante (Seramun GmbH, Heidesee, Alemania) y se revelaron con sustrato de peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina listo para su uso (Seramun, Heidesee, Alemania). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 0,25 mol/l después de 15 minutos. La densidad óptica (DO) de las muestras se leyó usando un lector de microplacas (SLT, Crailsheim, Alemania) a una longitud de onda de 450 nm/620 nm.

ELISA para la detección de anticuerpos específicos de ECe

Los anticuerpos IgA e IgG en suero contra tTG recombinante humano (anti-tTG) y dGD (anti-dGD) se determinaron mediante ELISA según las instrucciones del fabricante (GA Generic Assays GmbH) [34]. La densidad óptica se leyó en un lector de microplacas a 450 nm y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (U/ml). Para estos ensayos se usó el punto de corte de positividad a 10 U/ml de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo funcional [35] se determinó a 2 U/ml y 3 U/ml para IgA anti-tTG y anti-dGD, respectivamente, y 3 U/ml y 2 U/ml para IgG contra tTG y dGD, respectivamente.

Análisis estadístico

Se usaron las pruebas de Mann-Whitney de dos colas, no paramétrica, y de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias estadísticamente significativas de muestras independientes en 2 o más grupos, respectivamente. Se empleó la prueba de Wilcoxon no paramétrica para analizar muestras emparejadas. Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos. Los cálculos se realizaron con el software estadístico Medcalc (Medcalc, Mariakerke, Bélgica).

Ejemplo 1: Se dirigen anticuerpos anti-glucoproteína 2 en pacientes con enfermedad celíaca contra las isoformas largas 1 y 2

Los experimentos proporcionados en el presente documento muestran que en muestras de suero obtenidas de pacientes con ECe, se observaron niveles significativamente mayores de IgG para las isoformas 1, 2 y 3 de GP2 cGP2red con respecto a las de donantes de sangre. La reactividad de IgG a la isoforma 4 no fue diferente ($p > 0,05$). Por el contrario, los niveles de IgA para las cuatro isoformas de GP2 mostraron niveles significativamente mayores en pacientes con enfermedad celíaca *de novo* que en los controles. Hubo una reactividad significativamente mayor de IgG e IgA a las isoformas de GP2 más largas 1 y 2 de GP2 cGP2red con respecto a las isoformas más cortas 3 y 4.

Sujetos

Se evaluaron diez muestras de suero de pacientes con ECe *de novo* y 50 sueros de control de donantes de sangre

sanos (DS). La mediana de edad de los 40 pacientes con ECe (8 mujeres) fue de 16 años con un intervalo intercuartil (IIC) de 6 años a 22 años. La mediana de edad de los DS (23 mujeres, 27 hombres) fue de 24 años (IIC 18-41). Los diagnósticos clínicos se basaron en criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos convencionales.

5 Resultados

Los pacientes con enfermedad celíaca *de novo* demostraron niveles significativamente mayores de IgG contra las isoformas 1, 2 y 3 de GP2 cGP2red con respecto a los de donantes de sangre ($p = 0,001$, $p = 0,004$, $p = 0,0388$, respectivamente) (fig. 2, 3). La reactividad de IgG a la isoforma 4 no fue diferente ($p > 0,05$). Por el contrario, los niveles de IgA para las 4 isoformas de GP2 mostraron niveles significativamente mayores en pacientes con enfermedad celíaca *de novo* que en los controles ($p < 0,001$, respectivamente). Hubo una reactividad significativamente mayor de IgG e IgA a las isoformas de GP2 más largas 1 y 2 de GP2 cGP2red con respecto a las isoformas más cortas 3 y 4 ($p > 0,05$, respectivamente).

Al investigar a pacientes con enfermedad celíaca *de novo* y controles, el análisis de la curva de características operativas del receptor reveló un área bajo la curva (ABC) significativamente mayor para autoanticuerpos IgG contra la isoforma 1 (0,898, IC al 95 %: 0,792 - 0,961) y 2 (0,854, IC al 95 %: 0,739 - 0,932) cGP2red con respecto a autoanticuerpos contra la isoforma 4 (0,638, IC al 95 %: 0,505 - 0,758, $p < 0,05$, respectivamente). Hubo una tendencia a una ABC mayor para IgG contra a la isoforma 1 y 2 en contraste con los autoanticuerpos contra la isoforma 3 (0,708, IC al 95 %: 0,576 - 0,818; $p = 0,0725$, $p = 0,0652$, respectivamente).

Los autoanticuerpos IgA contra la isoforma 1 (1,000, IC al 95 %: 0,940 - 1,000) y 2 (1,000, IC al 95 %: 0,940 - 1,000) demostró una ABC cGP2red significativamente mayor con respecto a autoanticuerpos contra la isoforma 3 (0,912, IC al 95 %: 0,810 - 0,970, $p < 0,05$, respectivamente). Hubo una tendencia a una ABC mayor para IgG contra a la isoforma 1 y 2 en contraste con los autoanticuerpos contra la isoforma 4 (0,957, IC al 95 %: 0,871 - 0,992; $p = 0,0712$, $p = 0,0712$, respectivamente).

En resumen, pueden usarse autoanticuerpos para las isoformas más largas de GP2 para el diagnóstico de la enfermedad celíaca *de novo* y se caracterizan por mejores características de rendimiento del ensayo que los autoanticuerpos para las isoformas más cortas.

Ejemplo 2: Se dirigen anticuerpos anti-glucoproteína 2 en pacientes con EC contra las isoformas largas 1 y 2

La invención también se basa en el hallazgo de que las isoformas de GP2 como se desvelan en el presente documento son sorprendentemente adecuadas para el diagnóstico o el control de la terapia de enfermedades inflamatorias crónicas u otras enfermedades autoinmunitarias, especialmente enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU). En particular, las nuevas isoformas de GP2 como se describen en el presente documento permiten una diferenciación más reproducible y más precisa entre EC y CU. Se pueden usar autoanticuerpos para las isoformas más cortas de GP2, en particular la isoforma 4, para el diagnóstico diferencial de enfermedades inflamatorias intestinales y muestran una mejor diferenciación de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Sujetos

44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre se analizaron para detectar IgG e IgA anti-isotipos de GP2. Los diagnósticos clínicos se basaron en criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos convencionales.

Resultados

El IgG contra la isoforma 1 de GP2 demostró valores de DO significativamente diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre (Fig. 5, $p < 0,0001$). Los pacientes con EC demostraron IgG elevado contra la isoforma 1 de GP2 en comparación con los de pacientes con CU y donantes de sangre ($p < 0,05$). Asimismo, los pacientes con CU tenían mayores anticuerpos contra la isoforma 1 que los donantes de sangre ($p < 0,05$).

De manera análoga, IgG contra las isoformas 2 y 3 de GP2 también demostró valores de DO significativamente diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre (Fig. 6, 7, $p < 0,0001$). Los pacientes con EC demostraron IgG elevado contra las isoformas 2 y 3 de GP2 en comparación con los de pacientes con CU y donantes de sangre ($p < 0,05$, respectivamente). Asimismo, los pacientes con CU tenían mayores anticuerpos contra la isoforma 2 y 3 que los donantes de sangre ($p < 0,05$, respectivamente).

El IgG contra la isoforma 4 de GP2 también demostró valores de DO significativamente diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre (Fig. 8, $p < 0,0001$). Los pacientes con EC revelaron IgG elevado contra la isoforma 4 de GP2 en comparación con los de pacientes con CU y donantes de sangre ($p < 0,05$). Sin embargo, los pacientes con CU no tenían un nivel de anticuerpos diferente a la isoforma 4 en comparación con los donantes de sangre ($p > 0,05$).

El IgA contra las isoformas 1, 3 y 4 de GP2 también demostró valores de DO significativamente diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre ($p < 0,0001$). Los pacientes con EC mostraron IgGA elevado contra las isoformas 1, 3 y 4 de GP2 en comparación con los de pacientes con CU y donantes de sangre ($p < 0,05$, respectivamente). Sin embargo, los pacientes con CU no tenían un nivel de anticuerpos diferente a esas 3 isoformas en comparación con los donantes de sangre ($p > 0,05$).

El IgA contra la isoforma 2 de GP2 también demostró valores de DO significativamente diferentes en 44 pacientes con EC, 30 pacientes con CU y 21 donantes de sangre ($p < 0,0001$). Los pacientes con EC revelaron IgG elevado contra la isoforma 2 de GP2 en comparación con los de pacientes con CU ($p < 0,05$) pero no de donantes de sangre ($p > 0,05$).

Los resultados muestran que, a través de un análisis de características operativas del receptor (ROC), las nuevas isoformas de GP2, en particular isoforma 4 de GP2, permiten mejor detección y/o diferenciación para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU).

Los experimentos desvelados en el presente documento demuestran que es posible una clara diferenciación entre EC y CU a nivel serológico mediante el uso de las isoformas desveladas en el presente documento, preferentemente isoformas 3 y/o 4 de GP2 (Fig. 7 y 8). Como se puede observar en estas figuras, los autoanticuerpos IgG de pacientes con CU no se unen a las isoformas 3 y 4 de GP2. Por lo tanto, el uso de las isoformas 3 y 4 en el método de diagnóstico como se describe en el presente documento permitirá una clara diferenciación entre los pacientes con EC y CU. #

Abreviaturas

DS, donante de sangre; ECe, enfermedad celíaca; IC, intervalo de confianza; EC o ECr, enfermedad de Crohn; CV, coeficiente de variación; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; DSG, dieta sin gluten; GP2, glucoproteína 2; EII, enfermedad inflamatoria intestinal; IIC, intervalo intercuartil; célula M, célula microplegada o membranosa; PAB, autoanticuerpo pancreático; rho, coeficiente de correlación de rango de Spearman; TA, temperatura ambiente, colitis ulcerosa CU,

Bibliografía

1. Ronzio RA, Kronquist KE, Lewis DS, MacDonald RJ, Mohrlök SH, O'Donnell JJ, Jr.: Glycoprotein synthesis in the adult rat pancreas. IV. Subcellular distribution of membrane glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1978, 508: 65-84.
2. Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Buttner T, Jungblut PR, Porstmann T, Laass MW, Henker J, Buning C *et al.*: Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 2009, 58: 1620-1628.
3. Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stocker K, Sina C, Fellermann K, Stocker W: Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: The glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis* 2012, pii: S1873-9946 (12) 00433-3. doi: 10.1016/j.crohns.2012.10.011. [Publicación electrónica previa a la impresión].
4. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S *et al.*: Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 2009, 462: 226-230.
5. Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, Ohno H, Kurokawa S, Mejima M, Takayama N *et al.*: Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2008, 180: 7840-7846.
6. Werner L, Paclik D, Fritz C, Reinhold D, Roggenbuck D, Sturm A: Identification of pancreatic Glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2012, 189: 2774-2783.
7. Holzl MA, Hofer J, Kovarik JJ, Roggenbuck D, Reinhold D, Goihl A, Gartner M, Steinberger P, Zlabinger GJ: The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells I (SREC-I). *Cell Immunol* 2011, 267: 88-93.
8. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG *et al.*: Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 2007, 1: 403-418.
9. Sollid LM: Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 647-655.
10. Tibble J, Sighthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I: Faecal calprotectin and faecal occult

blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001, 49: 402-408.

11. de KS, Keszthelyi D, Masclee AA: Leaky gut and diabetes mellitus: what is the link? *Obes Rev.* 2011, 12: 449-458.
- 5 12. Bossuyt X: Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006, 52: 171-181.
13. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E: Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 1995, 155: 5419-5426.
- 10 14. Baekkeskov S, Kanaani J, Jaume JC, Kash S: Does GAD have a unique role in triggering IDDM? *J Autoimmun* 2000, 15: 279-286.
- 15 15. Conrad K, Schmechta H, Klafki A, Lobeck G, Uhlig HH, Gerdi S, Henker J: Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14: 129-135.
16. Bogdanos DP, Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Pavlidis P, von Arnim U, Malfertheiner P, Forbes A, Conrad C, Laass M: Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2012, 12: 102.
- 20 17. Rieder F, Franke A, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Roggenbuck D, Rogler G, Klebl F: Mo1247 Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated With Strictures and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2013, 144: -S617.
- 25 18. Roggenbuck D, Reinhold D, Werner L, Schierack P, Bogdanos DP, Conrad K: Glycoprotein 2 antibodies in Crohn's disease. *Adv Clin Chem* 2013, 60: 187-208.
- 30 19. Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Gohl A, von Arnim U, Malfertheiner P, Buttner T, Porstmann T, Porstmann S, Liedvogel B *et al.*: Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin Chim Acta* 2011, 412: 718-724.
- 35 20. Bogdanos DP, Rigopoulou EI, Smyk DS, Roggenbuck D, Reinhold D, Forbes A, Laass MW, Conrad K: Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011, 11: 143-148.
21. Op De BK, Vermeire S, Rutgeerts P, Bossuyt X: Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2010.
- 40 22. Pavlidis P, Romanidou O, Roggenbuck D, Mytilinaou M, Al-Sulttan F, Liaskos C, Smyk DS, Koutsoumpas A, Rigopoulou E, Conrad K *et al.*: Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with crohn's disease. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012: 640835.
- 45 23. Somma V, Ababneh H, Ababneh A, Gatti S, Romagnoli V, Bendia E, Conrad K, Bogdanos DP, Roggenbuck D, Ciarrocchi G: The Novel Crohn's Disease Marker Anti-GP2 Antibody Is Associated with Ileocolonic Location of Disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013, 2013: 683824.
24. Roggenbuck D, Reinhold D, Schierack P, Bogdanos DP, Conrad K, Laass MW: Crohn's disease specific pancreatic antibodies: clinical and pathophysiological challenges. *Clin Chem Lab Med* 2013, 1-12.
- 50 25. Bonaci-Nikolic B, Spuran M, Andrejevic S, Nikolic M: Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in patients with gluten-sensitive enteropathy: A possible serological trap. *Clin Chim Acta* 2012, 413: 822-823.
- 55 26. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN *et al.*: The Oslo definitions for coeliac disease and related terms [resumen]. 2012, 1
27. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, Sjobahl R: Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999, 117: 65-72.
- 60 28. Bjarnason I: Intestinal permeability. *Gut* 1994, 35: S18-S22.
29. Baumgart DC, Carding SR: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007, 369: 1627-1640.
- 65 30. Rieder F, Lawrance IC, Leite A, Sans M: Predictors of fibrostenotic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011,

17: 2000-2007.

31. Bardella MT, Elli L, De MS, Floriani I, Torri V, Piodi L: Autoimmune disorders in patients affected by celiac sprue and inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2009, 41: 139-143.

5

32. Fasano A: Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012, 42: 71-78.

33. Fukuoka S: Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding alpha (large) and beta (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1491: 376-380.

10

34. Conrad K, Roggenbuck D, Ittenson A, Reinhold D, Buettner T, Laass MW: A new dot immunoassay for simultaneous detection of celiac specific antibodies and IgA-deficiency. *Clin Chem Lab Med* 2011, 50: 337-343.

15

35. Zöphel K, Wunderlich G, Kotzerke J, von Landenberg P, Roggenbuck D: M22 based (manual) ELISA for TSH-receptor antibody (TRAb) measurement is more sensitive than 2nd generation TRAb assays. *Clin Chim Acta* 2009, 403: 266.

LISTADO DE SECUENCIAS

20

<110> GA Generic Assays

<120> ISOFORMAS DE GP2 Y SU USO EN LA CAPTURA DE AUTOANTICUERPOS

25

<130> XII 2047/14EP1

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 537

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 1

ES 2 790 577 T3

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Gly
 20 25 30

Tyr Gly Asn Pro Ile Glu Ala Ser Ser Tyr Gly Leu Asp Leu Asp Cys
 35 40 45

Gly Ala Pro Gly Thr Pro Glu Ala His Val Cys Phe Asp Pro Cys Gln
 50 55 60

Asn Tyr Thr Leu Leu Asp Glu Pro Phe Arg Ser Thr Glu Asn Ser Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Gln Gly Cys Asp Lys Asn Met Ser Gly Trp Tyr Arg Phe Val
 85 90 95

Gly Glu Gly Gly Val Arg Met Ser Glu Thr Cys Val Gln Val His Arg
 100 105 110

Cys Gln Thr Asp Ala Pro Met Trp Leu Asn Gly Thr His Pro Ala Leu
 115 120 125

Gly Asp Gly Ile Thr Asn His Thr Ala Cys Ala His Trp Ser Gly Asn
 130 135 140

Cys Cys Phe Trp Lys Thr Glu Val Leu Val Lys Ala Cys Pro Gly Gly
 145 150 155 160

Tyr His Val Tyr Arg Leu Glu Gly Thr Pro Trp Cys Asn Leu Arg Tyr
 165 170 175

ES 2 790 577 T3

Cys Thr Val Pro Arg Asp Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys
 180 185 190

Ala Cys Arg Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly
 195 200 205

Cys Phe Cys Arg Gln Asp Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln
 210 215 220

Pro Gln Leu Asp Cys Gly Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240

Cys Leu Leu Gly Gly Leu Gly Leu Gly Glu Glu Val Ile Ala Tyr Leu
 245 250 255

Arg Asp Pro Asn Cys Ser Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp
 260 265 270

Val Ser Val Thr Ser Pro Val Gln Ala Ser Ala Cys Arg Asn Ile Leu
 275 280 285

Glu Arg Asn Gln Thr His Ala Ile Tyr Lys Asn Thr Leu Ser Leu Val
 290 295 300

Asn Asp Phe Ile Ile Arg Asp Thr Ile Leu Asn Ile Asn Phe Gln Cys
 305 310 315 320

Ala Tyr Pro Leu Asp Met Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Leu Gln Pro
 325 330 335

Ile Val Ser Ser Leu Asn Val Ser Val Asp Gly Asn Gly Glu Phe Ile
 340 345 350

Val Arg Met Ala Leu Phe Gln Asp Gln Asn Tyr Thr Asn Pro Tyr Glu
 355 360 365

Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Val Glu Ser Val Leu Tyr Val Gly Ala
 370 375 380

Ile Leu Glu Gln Gly Asp Thr Ser Arg Phe Asn Leu Val Leu Arg Asn
 385 390 395 400

Cys Tyr Ala Thr Pro Thr Glu Asp Lys Ala Asp Leu Val Lys Tyr Phe
 405 410 415

Ile Ile Arg Asn Ser Cys Ser Asn Gln Arg Asp Ser Thr Ile His Val
 420 425 430

ES 2 790 577 T3

Glu Glu Asn Gly Gln Ser Ser Glu Ser Arg Phe Ser Val Gln Met Phe
 435 440 445

Met Phe Ala Gly His Tyr Asp Leu Val Phe Leu His Cys Glu Ile His
 450 455 460

Leu Cys Asp Ser Leu Asn Glu Gln Cys Gln Pro Ser Cys Ser Arg Ser
 465 470 475 480

Gln Val Arg Ser Glu Val Pro Ala Ile Asp Leu Ala Arg Val Leu Asp
 485 490 495

Leu Gly Pro Ile Thr Arg Arg Gly Ala Gln Ser Pro Gly Val Met Asn
 500 505 510

Gly Thr Pro Ser Thr Ala Gly Phe Leu Val Ala Trp Pro Met Val Leu
 515 520 525

Leu Thr Val Leu Leu Ala Trp Leu Phe
 530 535

<210> 2
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Gly
 20 25 30

Tyr Gly Asn Pro Ile Glu Ala Ser Ser Tyr Gly Leu Asp Leu Asp Cys
 35 40 45

Gly Ala Pro Gly Thr Pro Glu Ala His Val Cys Phe Asp Pro Cys Gln
 50 55 60

Asn Tyr Thr Leu Leu Asp Glu Pro Phe Arg Ser Thr Glu Asn Ser Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Gln Gly Cys Asp Lys Asn Met Ser Gly Trp Tyr Arg Phe Val
 85 90 95

Gly Glu Gly Gly Val Arg Met Ser Glu Thr Cys Val Gln Val His Arg
 100 105 110

10

ES 2 790 577 T3

Cys Gln Thr Asp Ala Pro Met Trp Leu Asn Gly Thr His Pro Ala Leu
 115 120 125

Gly Asp Gly Ile Thr Asn His Thr Ala Cys Ala His Trp Ser Gly Asn
 130 135 140

Cys Cys Phe Trp Lys Thr Glu Val Leu Val Lys Ala Cys Pro Gly Gly
 145 150 155 160

Tyr His Val Tyr Arg Leu Glu Gly Thr Pro Trp Cys Asn Leu Arg Tyr
 165 170 175

Cys Thr Asp Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys Ala Cys Arg
 180 185 190

Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly Cys Phe Cys
 195 200 205

Arg Gln Asp Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln Pro Gln Leu
 210 215 220

Asp Cys Gly Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys Cys Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Leu Gly Leu Gly Glu Glu Val Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Pro
 245 250 255

Asn Cys Ser Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp Val Ser Val
 260 265 270

Thr Ser Pro Val Gln Ala Ser Ala Cys Arg Asn Ile Leu Glu Arg Asn
 275 280 285

Gln Thr His Ala Ile Tyr Lys Asn Thr Leu Ser Leu Val Asn Asp Phe
 290 295 300

Ile Ile Arg Asp Thr Ile Leu Asn Ile Asn Phe Gln Cys Ala Tyr Pro
 305 310 315 320

Leu Asp Met Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Leu Gln Pro Ile Val Ser
 325 330 335

Ser Leu Asn Val Ser Val Asp Gly Asn Gly Glu Phe Ile Val Arg Met
 340 345 350

Ala Leu Phe Gln Asp Gln Asn Tyr Thr Asn Pro Tyr Glu Gly Asp Ala
 355 360 365

ES 2 790 577 T3

Val Glu Leu Ser Val Glu Ser Val Leu Tyr Val Gly Ala Ile Leu Glu
 370 375 380

Gln Gly Asp Thr Ser Arg Phe Asn Leu Val Leu Arg Asn Cys Tyr Ala
 385 390 395 400

Thr Pro Thr Glu Asp Lys Ala Asp Leu Val Lys Tyr Phe Ile Ile Arg
 405 410 415

Asn Ser Cys Ser Asn Gln Arg Asp Ser Thr Ile His Val Glu Glu Asn
 420 425 430

Gly Gln Ser Ser Glu Ser Arg Phe Ser Val Gln Met Phe Met Phe Ala
 435 440 445

Gly His Tyr Asp Leu Val Phe Leu His Cys Glu Ile His Leu Cys Asp
 450 455 460

Ser Leu Asn Glu Gln Cys Gln Pro Ser Cys Ser Arg Ser Gln Val Arg
 465 470 475 480

Ser Glu Val Pro Ala Ile Asp Leu Ala Arg Val Leu Asp Leu Gly Pro
 485 490 495

Ile Thr Arg Arg Gly Ala Gln Ser Pro Gly Val Met Asn Gly Thr Pro
 500 505 510

Ser Thr Ala Gly Phe Leu Val Ala Trp Pro Met Val Leu Leu Thr Val
 515 520 525

Leu Leu Ala Trp Leu Phe
 530

<210> 3
 <211> 390
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Val
 20 25 30

Pro Arg Asp Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys Ala Cys Arg
 35 40 45

10

ES 2 790 577 T3

Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly Cys Phe Cys
 50 55 60

Arg Gln Asp Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln Pro Gln Leu
 65 70 75 80

Asp Cys Gly Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys Cys Leu Leu
 85 90 95

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

Asn Cys Ser Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp Val Ser Val
 115 120 125

Thr Ser Pro Val Gln Ala Ser Ala Cys Arg Asn Ile Leu Glu Arg Asn
 130 135 140

Gln Thr His Ala Ile Tyr Lys Asn Thr Leu Ser Leu Val Asn Asp Phe
 145 150 155 160

Ile Ile Arg Asp Thr Ile Leu Asn Ile Asn Phe Gln Cys Ala Tyr Pro
 165 170 175

Leu Asp Met Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Leu Gln Pro Ile Val Ser
 180 185 190

Ser Leu Asn Val Ser Val Asp Gly Asn Gly Glu Phe Ile Val Arg Met
 195 200 205

Ala Leu Phe Gln Asp Gln Asn Tyr Thr Asn Pro Tyr Glu Gly Asp Ala
 210 215 220

Val Glu Leu Ser Val Glu Ser Val Leu Tyr Val Gly Ala Ile Leu Glu
 225 230 235 240

Gln Gly Asp Thr Ser Arg Phe Asn Leu Val Leu Arg Asn Cys Tyr Ala
 245 250 255

Thr Pro Thr Glu Asp Lys Ala Asp Leu Val Lys Tyr Phe Ile Ile Arg
 260 265 270

Asn Ser Cys Ser Asn Gln Arg Asp Ser Thr Ile His Val Glu Glu Asn
 275 280 285

Gly Gln Ser Ser Glu Ser Arg Phe Ser Val Gln Met Phe Met Phe Ala

ES 2 790 577 T3

290		295		300											
Gly	His	Tyr	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	His	Cys	Glu	Ile	His	Leu	Cys	Asp
305					310					315					320
Ser	Leu	Asn	Glu	Gln	Cys	Gln	Pro	Ser	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Val	Arg
				325					330					335	
Ser	Glu	Val	Pro	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro
			340					345						350	
Ile	Thr	Arg	Arg	Gly	Ala	Gln	Ser	Pro	Gly	Val	Met	Asn	Gly	Thr	Pro
		355					360					365			
Ser	Thr	Ala	Gly	Phe	Leu	Val	Ala	Trp	Pro	Met	Val	Leu	Leu	Thr	Val
	370					375					380				
Leu	Leu	Ala	Trp	Leu	Phe										
385					390										

5

<210> 4
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 790 577 T3

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Asp
 20 25 30

Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys Ala Cys Arg Pro Glu Glu
 35 40 45

Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly Cys Phe Cys Arg Gln Asp
 50 55 60

Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln Pro Gln Leu Asp Cys Gly
 65 70 75 80

Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys Cys Leu Leu Gly Gly Leu
 85 90 95

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

Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp Val Ser Val Thr Ser Pro

ES 2 790 577 T3

Gly Phe Leu Val Ala Trp Pro Met Val Leu Leu Thr Val Leu Leu Ala
370 375 380

Trp Leu Phe
385

5 <210> 5
<211> 1614
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 790 577 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc 60
 tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgaggttatg gaaaccccat tgaagccagt 120
 tcgtatgggc tggacctgga ctgctggagct cctggcacc cagaggctca tgtctgtttt 180
 gaccctgtc agaattacac cctcctggat gaacccttcc gaagcacaga gaactcagca 240
 ggggccagc ggtgcgataa aaacatgagc ggctgggtacc gctttgtagg ggaaggagga 300
 gtaaggatgt cggagacctg tgtccagggt caccgatgcc agacagacgc tcccatgtgg 360
 ctgaatggga cccaccctgc ccttggggat ggcacaccca accacactgc ctgtgcccat 420
 tggagtggca actgctgttt ctggaaaaca gaggtgctgg tgaaggcctg cccaggcggg 480
 taccatgtgt accggttga aggcaactcc tgggtgtaatc tgagatactg cacagttcca 540
 cgagacccat cactgtgga ggacaagtgt gagaaggcct gccgccccga ggaggagtgc 600
 cttgccctca acagcacctg gggctgtttc tgcagacagg acctcaatag ttctgatgtc 660
 cacagtttgc agcctcagct agactgtggg cccagggaga tcaagtgaa ggtggacaaa 720
 tgtttgctgg gaggcctggg tttgggggag gaggtcattg cctacctgcg agacccaaac 780
 tgcagcagca tcttgcagac agaggagagg aactgggtat ctgtgaccag ccccgctccag 840
 gctagtgcct gcaggaacat tctggagaga aatcaaacc atgccatcta caaaaacacc 900
 ctctccttgg tcaatgattt catcatcaga gacaccatcc tcaacatcaa cttccaatgt 960
 gcctaccac tggacatgaa agtcagcctc caagctgcct tgcagcccat tgtaagttcc 1020
 ctgaacgtca gtgtggacgg gaatggagag ttcatgtca ggatggcct cttccaagac 1080
 cagaactaca cgaatcctta cgaaggggat gcagttgaac tgtctgttga gtccgtgctg 1140
 tatgtgggtg ccatcttga acaaggggac acctcccggt ttaacctggt gttgaggaac 1200
 tgctatgcca ccccactga agacaaggct gaccttgtga agtatttcat catcagaaac 1260
 agctgctcaa atcaacgtga ttccaccatc cacgtggagg agaatgggca gtccctcgaa 1320
 agccggttct cagttcagat gttcatgttt gctggacatt atgacctagt tttcctgcat 1380
 tgtgagattc atctctgtga ttctcttaat gaacagtgcc agccttcttg ctcaagaagt 1440
 caagtccgca gtgaagtacc ggccatcgac ctagcccggt ttctagattt ggggccccatc 1500
 actcggagag gtgcacagtc tcccgggtgc atgaatggaa cccctagcac tgcagggttc 1560
 ctggtggcct ggcctatggt cctcctgact gtccctctgg cttggctgtt ctga 1614

<210> 6
 <211> 1605
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

ES 2 790 577 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc 60
 tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgaggttatg gaaaccccat tgaagccagt 120
 tcgtatgggc tggacctgga ctgctggagct cctggcacc cagaggctca tgtctgtttt 180
 gaccctgtc agaattacac cctcctggat gaacccttcc gaagcacaga gaactcagca 240
 ggggtcccagg ggtgcgataa aaacatgagc ggctgggtacc gctttgtagg ggaaggagga 300
 gtaaggatgt cggagacctg tgtccagggtg caccgatgcc agacagacgc tcccatgtgg 360
 ctgaatggga cccaccctgc ccttggggat ggcacacca accacactgc ctgtgcccat 420
 tggagtggca actgctgttt ctggaaaaca gaggtgctgg tgaaggcctg cccaggcggg 480
 taccatgtgt accggttga aggactccc tgggtgtaatc tgagatactg cacagacca 540
 tccactgtgg aggacaagtg tgagaaggcc tgccgccccg aggaggagt ccttgcctc 600
 aacagcacct ggggctgttt ctgcagacag gacctcaata gttctgatgt ccacagtttg 660
 cagcctcagc tagactgtgg gcccaggag atcaaggta aggtggacia atgtttgctg 720
 ggaggcctgg gtttggggga ggaggtcatt gcctacctgc gagacccaaa ctgcagcagc 780
 atcttgca cagaggagag gaactgggta tctgtgacca gccccgtcca ggctagtgcc 840
 tgcaggaaca ttctggagag aatcaaacc catgccatct acaaaaacac cctctccttg 900
 gtcaatgatt tcatcatcag agacaccatc ctcaacatca acttccaatg tgcctacca 960
 ctggacatga aagtcagcct ccaagctgcc ttgcagccca ttgtaagttc cctgaacgtc 1020
 agtgtggacg ggaatggaga gttcattgtc aggatggccc tcttccaaga ccagaactac 1080
 acgaatcctt acgaagggga tgcagttgaa ctgtctgttg agtccgtgct gtatgtgggt 1140
 gccatcttgg aacaagggga cacctcccgg tttaacctgg tgttgaggaa ctgctatgcc 1200
 acccccactg aagacaaggc tgacctgtg aagtatttca tcatcagaaa cagctgctca 1260
 aatcaacgtg attccacat ccacgtggag gagaatgggc agtcctcgga aagccggttc 1320
 tcagttcaga tgttcatggt tgctggacat tatgacctag ttttctgca ttgtgagatt 1380
 catctctgtg attctcttaa tgaacagtgc cagccttctt gctcaagaag tcaagtccgc 1440
 agtgaagtac cggccatcga cctagcccgg gttctagatt tggggcccat cactcggaga 1500
 ggtgcacagt ctcccgggtg catgaatgga acccctagca ctgcagggtt cctggtggcc 1560
 tggcctatgg tcctcctgac tgcctcctg gcttggctgt tctga 1605

<210> 7
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

5

ES 2 790 577 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc 60
 tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgagttccac gagaccatc cactgtggag 120
 gacaagtgtg agaaggcctg ccgccccgag gaggagtgcc ttgccctcaa cagcacctgg 180
 ggctgtttct gcagacagga cctcaatagt tctgatgtcc acagtttgca gcctcagcta 240
 gactgtgggc ccagggagat caaggtgaag gtggacaaat gtttgctggg aggcctgggt 300
 ttgggggagg aggtcattgc ctacctgoga gacccaaact gcagcagcat cttgcagaca 360
 gaggagagga actgggtatc tgtgaccagc cccgtccagg ctagtgcctg caggaacatt 420
 ctggagagaa atcaaaccca tgccatctac aaaaacaccc tctccttggg caatgatttc 480
 atcatcagag acaccatcct caacatcaac ttccaatgtg cctaccact ggacatgaaa 540
 gtcagcctcc aagctgcctt gcagcccatt gtaagttccc tgaacgtcag tgtggacggg 600
 aatggagagt tcattgtcag gatggccctc ttccaagacc agaactacac gaatccttac 660
 gaaggggatg cagttgaact gtctgttgag tccgtgctgt atgtgggtgc catcttgaa 720
 caaggggaca cctcccgggt taacctggtg ttgaggaact gctatgccac ccccactgaa 780
 gacaaggctg accttgtgaa gtatttcatc atcagaaaca gctgctcaa tcaacgtgat 840
 tccaccatcc acgtggagga gaatgggcag tcctcgaaa gccggttctc agttcagatg 900
 ttcatgtttg ctggacatta tgacctagtt ttctgcatt gtgagattca tctctgtgat 960
 tctcttaatg aacagtcca gccttcttgc tcaagaagtc aagtccgag tgaagtaccg 1020
 gccatcgacc tagcccgggt tctagatttg gggccatca ctoggagagg tgcacagtct 1080
 cccggtgtca tgaatggaac ccctagcact gcagggttcc tgggtggcctg gcctatggtc 1140
 ctctgactg tctcctggc ttggctgttc tga 1173

<210> 8
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc 60
 tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgagaccat ccactgtgga ggacaagtgt 120
 gagaaggcct gccgccccga ggaggagtgc cttgccctca acagcacctg gggctgtttc 180

10

ES 2 790 577 T3

tgcagacagg acctcaatag ttctgatgtc cacagtttgc agcctcagct agactgtggg	240
cccagggaga tcaaggtgaa ggtggacaaa tgtttgctgg gaggcctggg tttgggggag	300
gaggtcattg cctacctgcg agacccaaac tgcagcagca tcttgacagc agaggagagg	360
aactgggtat ctgtgaccag ccccggtccag gctagtgcct gcaggaacat tctggagaga	420
aatcaaacc atgcatcta caaaaacacc ctctccttgg tcaatgattt catcatcaga	480
gacaccatcc tcaacatcaa cttccaatgt gcctaccac tggacatgaa agtcagcctc	540
caagctgcct tgcagcccat tgtaagtcc ctgaacgtca gtgtggacgg gaatggagag	600
ttcattgtca ggatggcct cttccaagac cagaactaca cgaatcctta cgaaggggat	660
gcagttgaac tgtctgttga gtccgtgctg tatgtgggtg ccatcttga acaaggggac	720
acctcccgt ttaacctggt gttgaggaac tgctatgcca cccccactga agacaaggct	780
gaccttgtga agtatttcat catcagaaac agctgctcaa atcaacgtga ttccaccatc	840
cacgtggagg agaatgggca gtccctcgaa agccggttct cagttcagat gttcatgttt	900
gctggacatt atgacctagt tttcctgcat tgtgagattc atctctgtga ttctcttaat	960
gaacagtgcc agccttcttg ctcaagaagt caagtccgca gtgaagtacc ggccatcgac	1020
ctagcccggg ttctagattt ggggccatc actcggagag gtgcacagtc tcccgggtgc	1080
atgaatgaa ccctagcac tgcagggttc ctggtggcct ggcctatggt cctcctgact	1140
gtcctcctgg cttggctgtt ctga	1164

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de colangitis esclerosante primaria mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende

- 5 - proporcionar una muestra de un sujeto que presenta síntomas y/o se sospecha que tiene colangitis esclerosante primaria,
- proporcionar dos o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), en donde se proporcionan al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4, en donde las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y 4 son según las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4, respectivamente, o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4,
- poner en contacto dicha muestra con dichas isoformas de GP2 y
- detectar autoanticuerpos de dicha muestra que se unen con dichas una o más isoformas
- 15 - en donde las etapas de contacto y detección comprenden: permitir que los autoanticuerpos en dicha muestra se unan con más de una de dichas isoformas de GP2, formando de este modo un complejo (complejo GP2-autoanticuerpo), poner en contacto dicho complejo con un marcador para formar un complejo marcado; y detectar la presencia o ausencia del complejo marcado para dichas isoformas de GP2 y asociar la presencia de los autoanticuerpos detectados en la muestra con la presencia de colangitis esclerosante primaria.

2. Equipo para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2), que comprende dos o más isoformas de GP2, en donde al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4 están presentes, en donde las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y 4 son según las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4, respectivamente, o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4.

3. Equipo para el diagnóstico de un trastorno autoinmunitario mediante la detección de autoanticuerpos de una muestra que se unen con una o más isoformas de glucoproteína 2 (GP2) según la reivindicación anterior, que comprende además:

- uno o más anticuerpos humanos antiinmunoglobulina, en donde dichos anticuerpos humanos anti-inmunoglobulina se unen a autoanticuerpos de los subtipos de IgG, IgA y/o IgM,
- un marcador, capaz de unirse a dicho anticuerpo humano anti-inmunoglobulina o ligado a dicho anticuerpo anti-inmunoglobulina, y
- un medio para detectar dicho marcador, y
- una fase sólida en la que al menos una de las isoformas 1 y/o 2 y al menos una de las isoformas 3 y/o 4 se inmovilizan mediante un conector o espaciador, o mediante unión o reticulación, en donde las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1, 2, 3 y 4 son según las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4, respectivamente, o secuencias de aminoácidos de más de 80 %, más de 85 %, más de 90 % o más preferentemente más de 95 % de identidad de secuencia con secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y 4.

Fig. 1

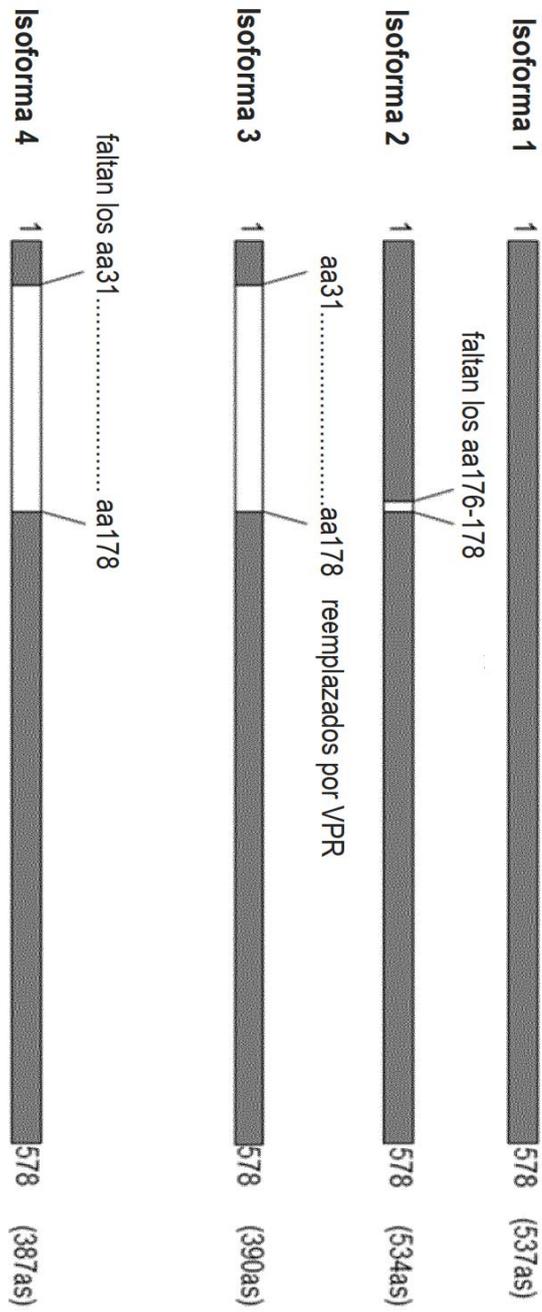


Fig. 2

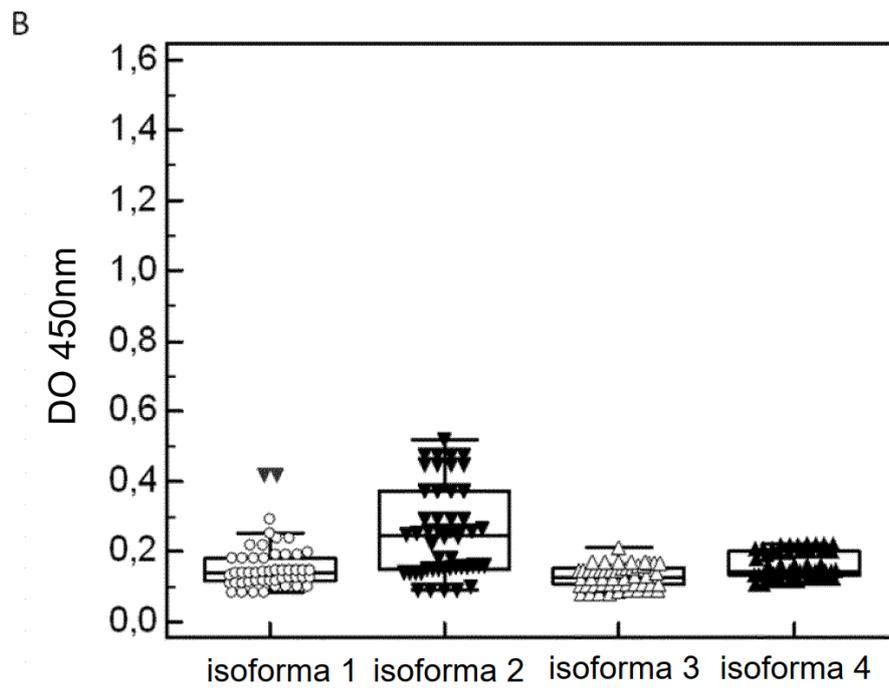
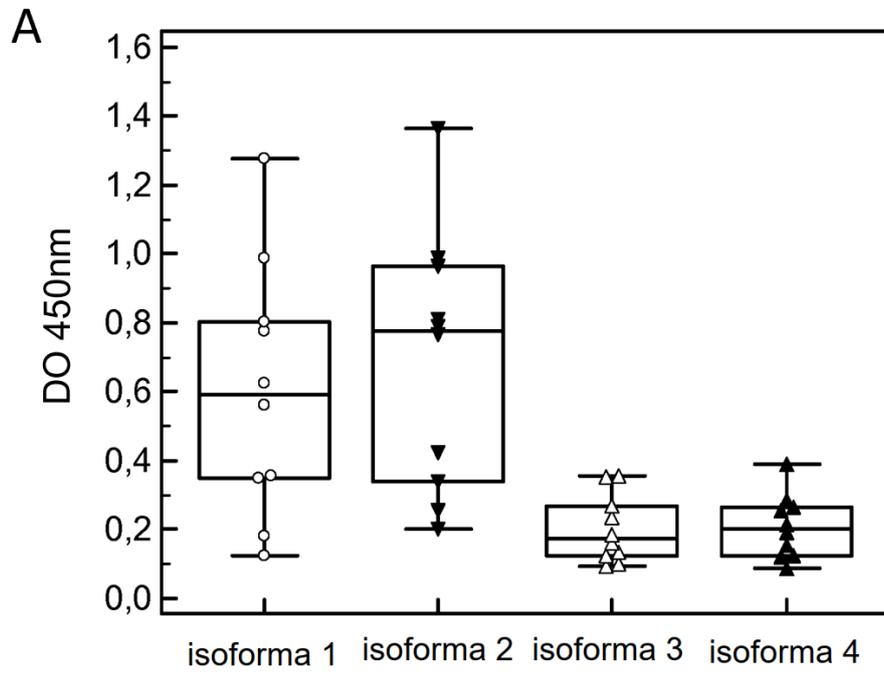


Fig. 3

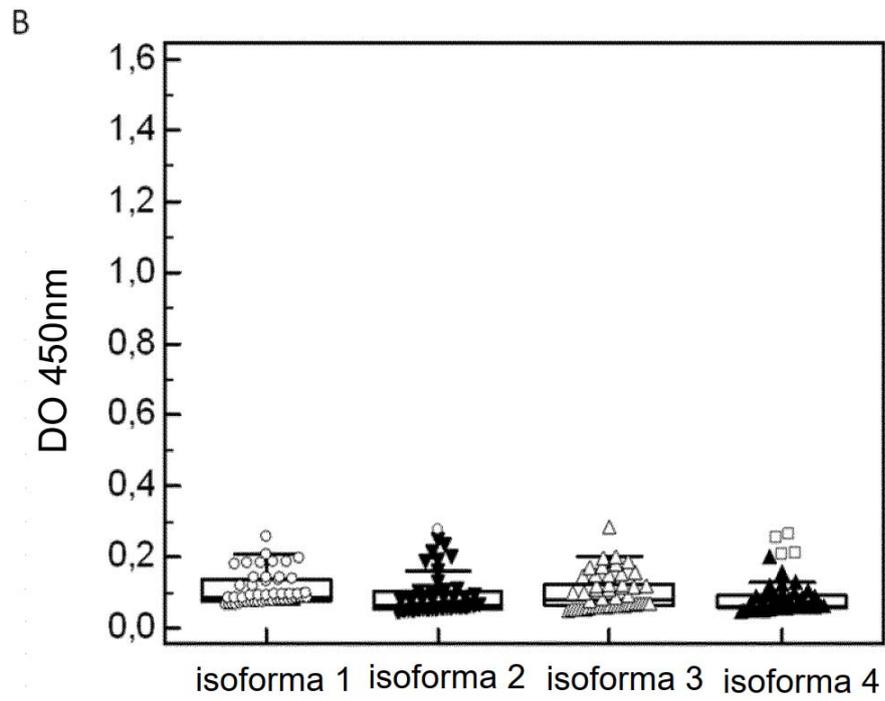
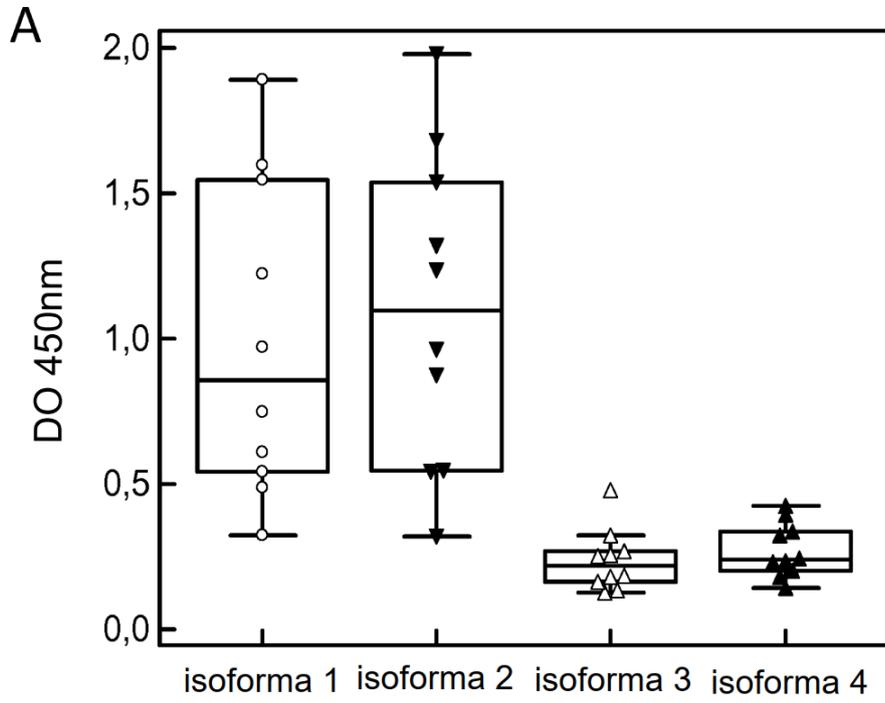
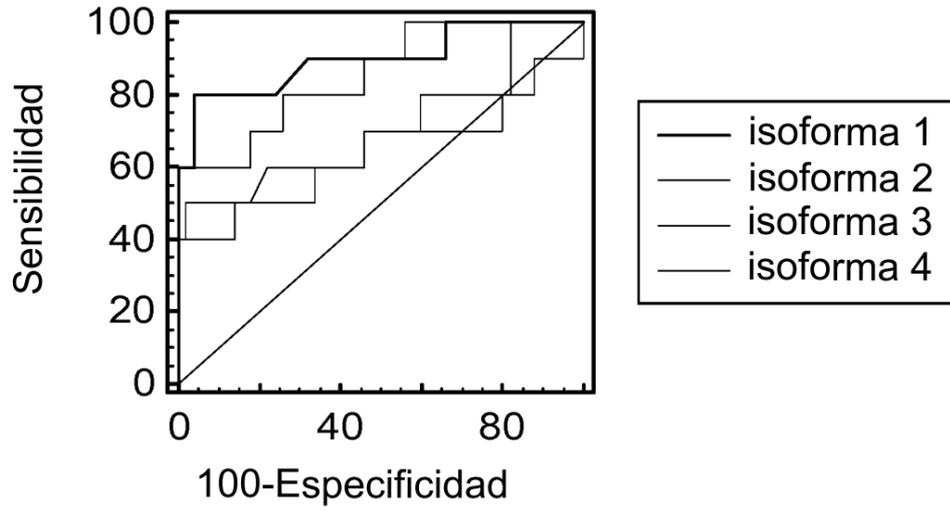


Fig. 4

A



B

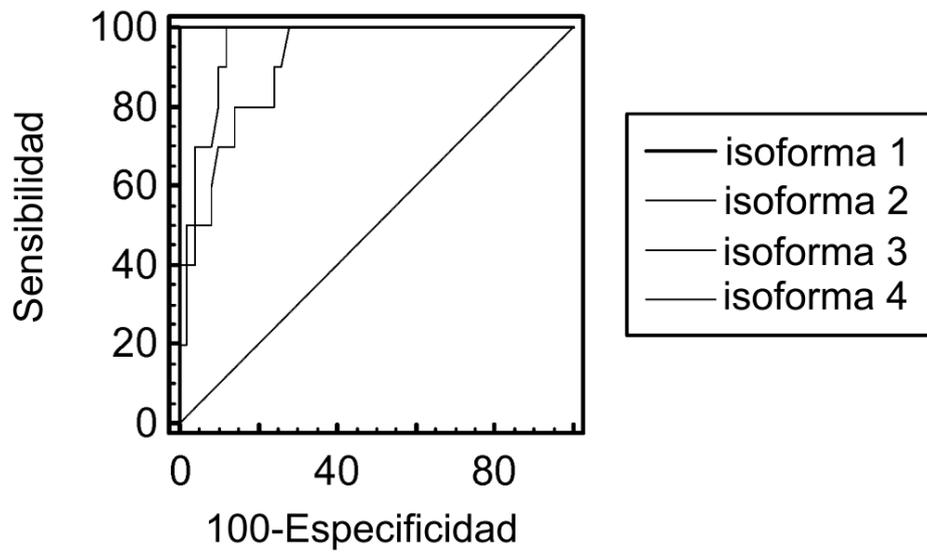


Fig. 5

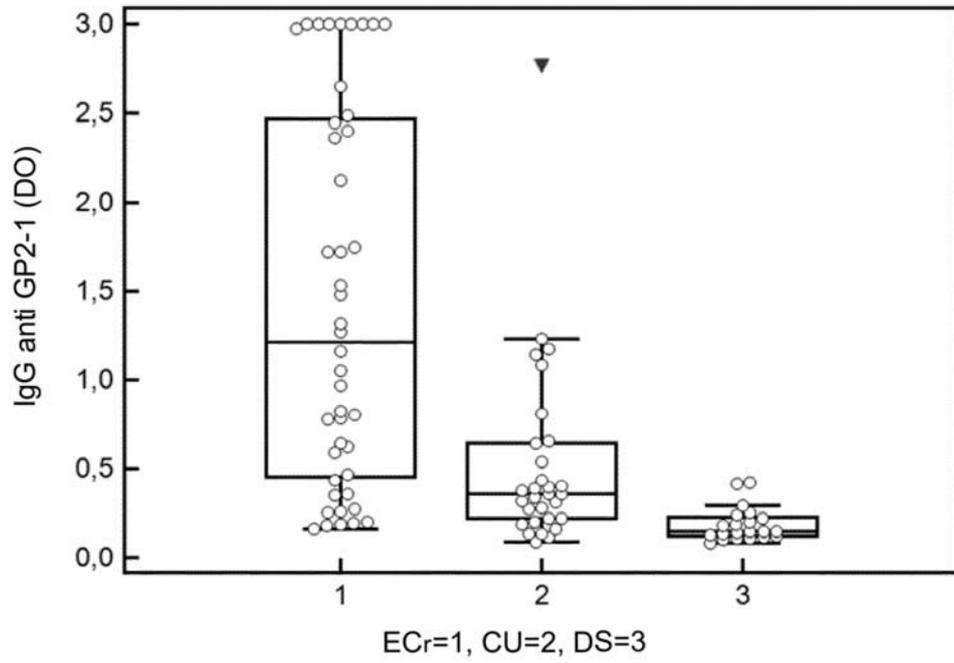


Fig. 6

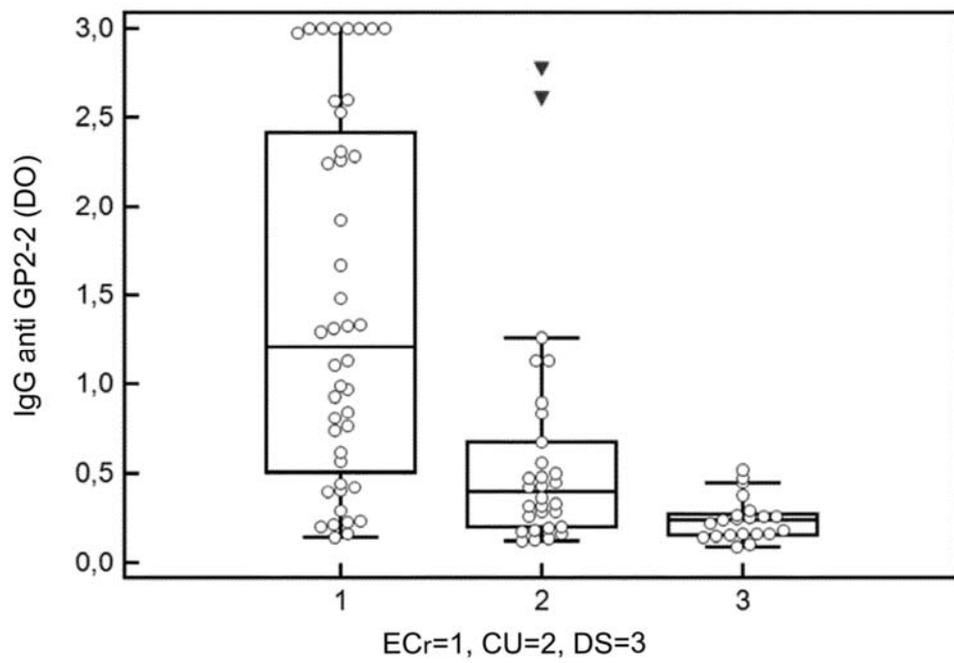


Fig. 7

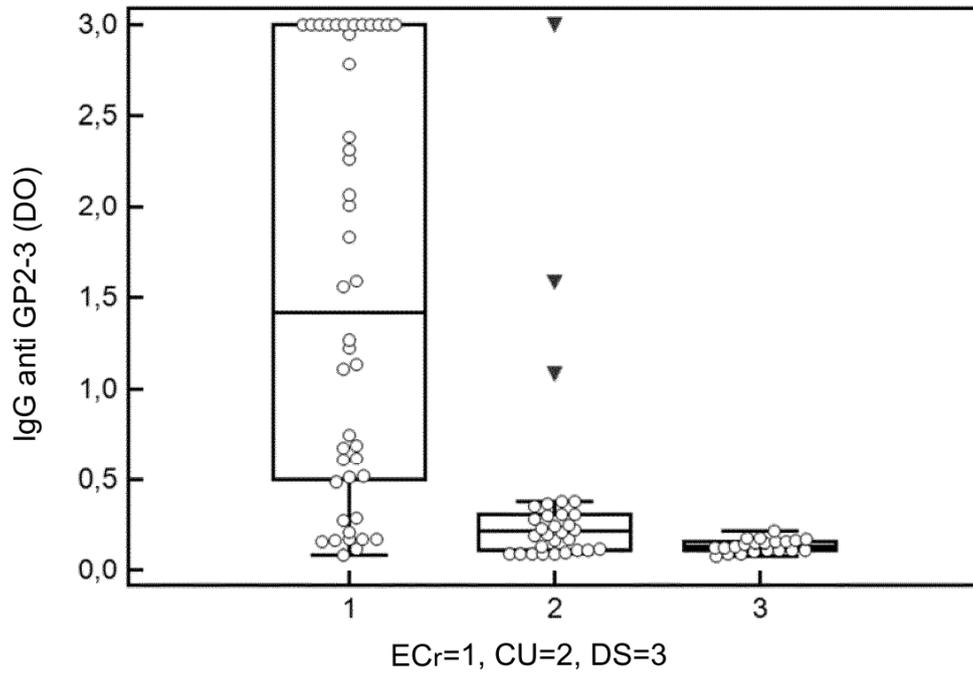


Fig. 8

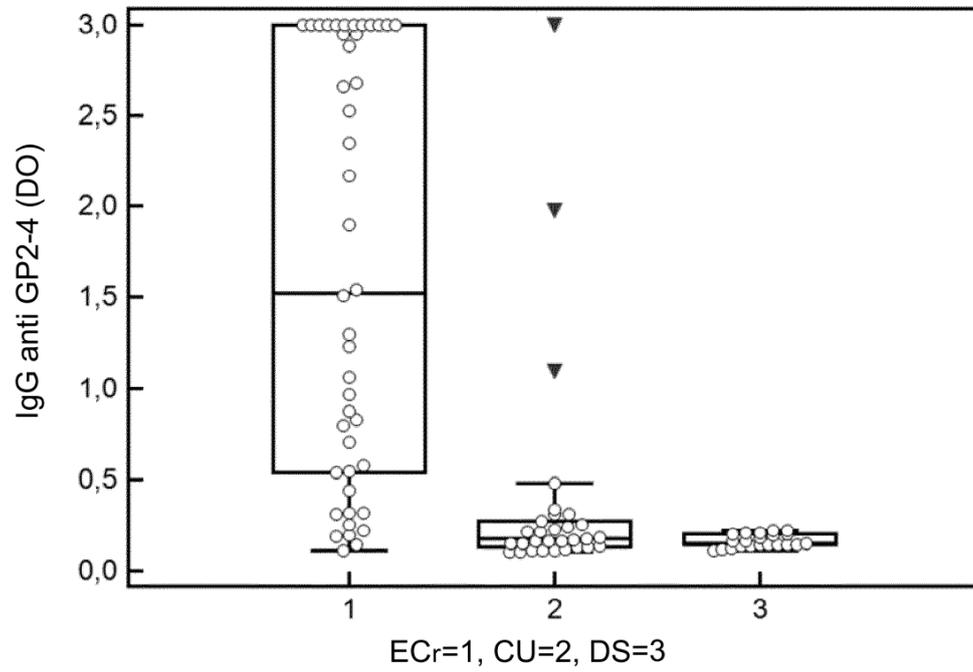
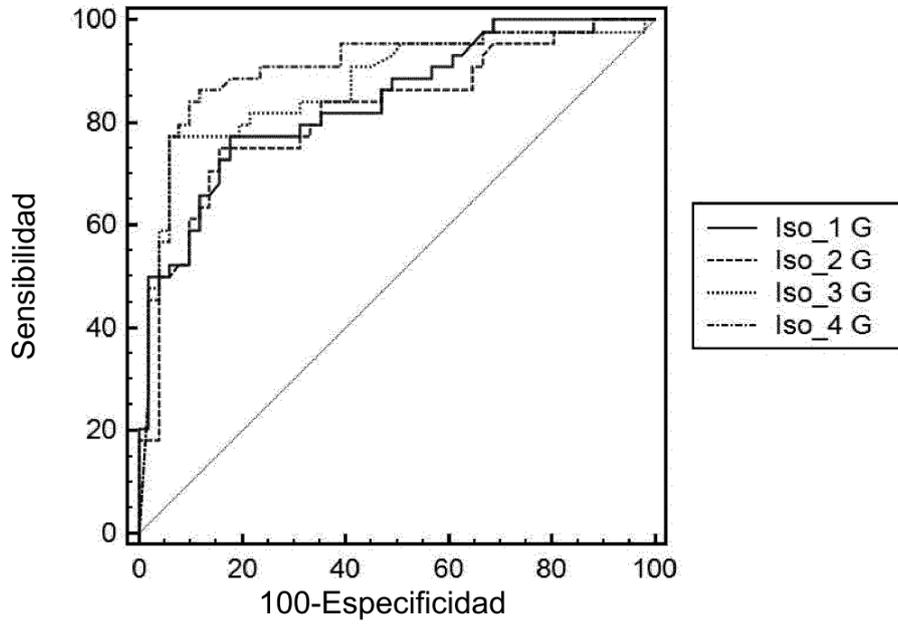


Fig. 9

A



B

