



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 248**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03784432 .1**

86 Fecha de presentación : **04.08.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1529216**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar esclerosis múltiple.**

30 Prioridad: **02.08.2002 US 400914 P**
13.02.2003 US 447076 P
15.04.2003 US 462984 P
23.05.2003 US 473231 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Glycominds Ltd.**
1 Yodfat Street, Alon Building, Global Park
Lod 71291, IL

72 Inventor/es: **Dotan, Nir;**
Dukler, Avinoam;
Schwarz, Mikael y
Gargir, Ari

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

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

Procedimiento para diagnosticar esclerosis múltiple.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a un procedimiento para el diagnóstico de la esclerosis múltiple y más en particular a un procedimiento para el diagnóstico de la esclerosis múltiple midiendo los niveles de anticuerpos contra glucanos en una muestra biológica.

10 **Antecedentes de la invención**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica del sistema nervioso central. Es una causa común de discapacidad crónica en adultos jóvenes. En los pacientes que padecen EM el sistema inmunitario destruye la cubierta de mielina de los axones en el cerebro y la médula espinal, produciendo una variedad de patologías neurológicas. En la forma más común de la EM, reincidente-remitente, a los episodios de empeoramiento agudo de la función neurológica (exacerbaciones, ataques) le siguen los periodos de recuperación parcial o completa (remisiones) en los que no hay avance de la enfermedad (estable). Se ha descrito que el noventa por ciento de los pacientes con EM inicialmente presentan un síndrome clínicamente aislado debido a una lesión desmielinizante inflamatoria en el nervio óptico, tallo cerebral o médula espinal. Aproximadamente el treinta por ciento de esos pacientes con un síndrome clínicamente aislado evolucionan a la EM clínicamente confirmada en los 12 meses siguientes después de la presentación. El posterior avance de la enfermedad puede variar significativamente de un paciente a otro. El avance puede ir desde un curso benigno a un curso de reincidencia-remisión, progresivo crónico o fulminante raro.

Un procedimiento de diagnóstico de la EM que facilitara la detección precoz de la EM clínicamente confirmada sería valioso tanto para tratar la enfermedad como para proporcionar asesoramiento para el paciente. Por ejemplo, a los pacientes con diagnóstico precoz de la EM clínicamente confirmada, se les podría ofrecer tratamientos de modificación de la enfermedad que recientemente se ha mostrado que son beneficiosos en la EM precoz.

Los procedimientos actuales para la evaluación y el seguimiento del avance de la EM se basan en la evaluación y puntuación de la función de los pacientes en los ataques y las discapacidades acumuladas durante los ataques. Una evaluación usada para evaluar la EM es la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS, por sus siglas en inglés) usada habitualmente. No obstante, la EDSS se basa en una evaluación subjetiva de la función del paciente.

Los procedimientos de diagnóstico también pueden incluir el seguimiento de las lesiones cerebrales mediante Imágenes por Resonancia Magnética (IRM) o el ensayo de Bandas OligoClonales (BOC) en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR). La IRM es un procedimiento físico para evaluar las lesiones cerebrales y es caro para el uso rutinario. Además, la correlación entre los resultados de la IRM y la actividad de la enfermedad es pobre. La Punción Cerebroespinal es un procedimiento invasivo desagradable que no es adecuado para el uso rutinario. Además, ambos procedimientos evalúan el daño sólo después de que se haya producido; ninguno de los procedimientos puede predecir el inicio de ataques. Otra desventaja del ensayo de las BOC en el LCR y de la IRM como modo de diagnóstico de la EM es que las BOC o la IRM negativos no excluyen la existencia de EM.

Se pone de manifiesto la necesidad de un procedimiento que usa marcadores evaluados de forma objetiva para el diagnóstico de la EM y para predecir el inicio de ataques en pacientes que padecen EM.

Resumen de la invención

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los pacientes con EM tienen niveles elevados en el suero de autoanticuerpos IgG, IgA, IgM que se unen a las estructuras de glucanos Glc(α) o Glc(α 1-4)Glc(α) o Glc(α 1-4)Glc(β) comparado con los niveles en el suero de estos autoanticuerpos en individuos sanos. Además, los mismos autoanticuerpos específicos para estas estructuras de glucanos son elevados durante el estado de exacerbación comparado con el nivel observado en pacientes en remisión y en individuos sanos. También se ha observado una correlación alta entre los niveles en el suero de anticuerpo IgM anti-Glc(α) en mujeres con EM (reincidente-remitente) clínicamente diagnosticadas y la puntuación de la EDSS (Escala Ampliada del Estado de Discapacidad) de las mujeres. La alta correlación indica que los niveles de IgM anti- α -Glucosa en el suero pueden actuar como un marcador indirecto de criterio de valoración clínico de la actividad de la enfermedad y como una forma de seguir la eficacia de un fármaco en ensayos clínicos.

El seguimiento de los niveles de estos anticuerpos en la sangre de pacientes que se sospecha que tienen EM facilita el diagnóstico precoz rápido y barato de pacientes con EM y la prescripción temprana de fármacos modificadores de la enfermedad. El seguimiento de los niveles de esos anticuerpos en la sangre de pacientes con EM confirmada también permitirá el seguimiento rápido y barato de los efectos de los fármacos prescritos y la detección precoz de ataques, permitiendo el tratamiento profiláctico temprano.

Entre las ventajas adicionales de la invención están que la existencia de EM en pacientes se puede determinar en una etapa temprana de la enfermedad, cuando sus síntomas se pueden parecer a muchas otras enfermedades de tipo EM. El diagnóstico precoz permite a los médicos tratar la EM más pronto en el curso de la enfermedad, minimizando

o previniendo de esta forma el daño causado por la destrucción de la mielina y las discapacidades causadas por esta destrucción. Además, los procedimientos descritos en la presente invención permiten a los médicos hacer el seguimiento de los pacientes con EM de forma regular, con el fin de evaluar la gravedad de la enfermedad, hacer el seguimiento de la terapia y cambiar el tratamiento cuando aparecen los signos de que se acercan ataques. Por ejemplo, un aumento de los biomarcadores indicativo de un ataque de EM puede justificar la administración de metilprednisona al paciente, que es un agente antiinflamatorio general administrado habitualmente durante los ataques.

Los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden usar para seleccionar el mejor tratamiento con fármacos para un paciente específico. Por ejemplo, un paciente puede empezar el curso del tratamiento con un fármaco determinado y el cambio en los niveles de marcadores será indicativo de la eficacia del fármaco. El retroceso de los niveles de marcadores a un estado de enfermedad indica que el fármaco está perdiendo eficacia y el fármaco se puede sustituir por un segundo fármaco después de un periodo de tiempo corto. De lo contrario, un médico tendría que esperar a los siguientes ataques para determinar si el fármaco es eficaz para el paciente específico.

Los biomarcadores descritos en el presente documento pueden actuar además como criterios de valoración indirectos para evaluar la respuesta de un paciente al fármaco ensayado de una forma barata. Un criterio de valoración indirecto basado en un ensayo serológico facilita el ensayo eficaz de potenciales fármacos nuevos para la EM.

En un aspecto, la invención se caracteriza por un procedimiento de diagnóstico de la esclerosis múltiple en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y detectar en la muestra de ensayo al menos un biomarcador que es un anticuerpo que se une específicamente a una estructura de glucano. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-Glc(β), un anticuerpo anti-Gal(β); un anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-L-Araf(α), un anticuerpo anti-L-Rha(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-4)GlcNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-GlcA(β), o un anticuerpo anti-GlcA(β), o un anticuerpo anti-Xyl(α). Los niveles de anticuerpo o anticuerpos en la muestra de ensayo se comparan con una muestra de control que se obtiene de uno o más individuos que muestran síntomas de esclerosis múltiple y de los que tienen síntomas de esclerosis múltiple con un estado de esclerosis múltiple conocido o de un individuo o individuos que no muestran síntomas de esclerosis múltiple. El estado de EM puede incluir, por ejemplo, exacerbaciones, ataques, remisiones y etapas estables de la enfermedad.

En diferentes realizaciones, se detectan al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 de estos anticuerpos. En algunas realizaciones, el anticuerpo detectado en la muestra de ensayo es un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) o tanto un anticuerpo anti-Glc(α) como un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α).

En algunas realizaciones, la muestra de control consiste en una población de uno o más individuos que no muestran síntomas de una esclerosis múltiple. En otras realizaciones, la muestra de control consiste en una población que no muestra síntomas de una esclerosis múltiple. La presencia de EM en la muestra de control se puede determinar usando técnicas conocidas en la técnica, p. ej., una evaluación de la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS) o una evaluación mediante Imagen por Resonancia Magnética (IRM), o ambas.

La muestra de ensayo puede ser, p. ej., un fluido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen, p. ej., sangre entera, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva.

El sujeto puede ser una mujer o un hombre.

El anticuerpo detectado puede ser, p. ej., un anticuerpo de tipo IgM o de tipo IgA o IgG.

En algunas realizaciones, el tipo de esclerosis múltiple detectada es la esclerosis múltiple precoz.

También se describe un procedimiento para diagnosticar una exacerbación de la esclerosis múltiple en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y detectar un anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α) y/o un anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en la muestra de ensayo. Los niveles del anticuerpo en la muestra de ensayo se comparan con una muestra de control, que se obtiene de uno o más individuos cuyo estado de esclerosis múltiple es conocido.

La muestra de control consiste en una población de uno o más individuos que no muestran síntomas de una exacerbación de la esclerosis múltiple y cuyo estado de la esclerosis múltiple está en remisión. Se diagnostica en el sujeto una exacerbación de la esclerosis múltiple si se encuentra más anticuerpo anti-Glc(α) o anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en la muestra de ensayo que en la muestra de control. La muestra de control consiste en una población de uno o más individuos que muestran síntomas de una exacerbación de la esclerosis múltiple, y se diagnostica una exacerbación de la esclerosis múltiple en el sujeto si los niveles de anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α) y/o anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α 1-4)Glc(α) están presentes en cantidades similares en la muestra de ensayo y la muestra de control.

La muestra de ensayo puede ser, p. ej., un fluido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen, p. ej., sangre entera, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo o saliva.

El sujeto puede ser una mujer o un hombre.

El anticuerpo detectado puede ser, p. ej., un anticuerpo de tipo IgM o IgA o de tipo IgG.

5 El diagnóstico es un diagnóstico precoz de la exacerbación de la esclerosis múltiple.

El sujeto se ha tratado con un agente terapéutico para la EM, p. ej., interferón beta o acetato de glatirámico administrado por vía subcutánea.

10 También se describe un procedimiento para evaluar la gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple en un sujeto. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α) y/o un anticuerpo de tipo IgM anti-Glc(α 1-4)Glc(α). La cantidad de anticuerpo en la muestra de ensayo se compara con la cantidad del anticuerpo en la muestra de control, la cual se obtiene de uno o más individuos cuya gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple se conoce.

15 La muestra de control consiste en una población de uno o más individuos cuya gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple está definida por la evaluación de Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS), cambios en la puntuación de la EDSS o una evaluación mediante Imagen por Resonancia Magnética (IRM).

20 La muestra de ensayo puede ser, p. ej., un fluido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen, p. ej., sangre entera, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva.

Si se desea el procedimiento puede incluir además seleccionar un agente terapéutico para tratar la esclerosis múltiple seleccionando un agente terapéutico y un régimen de dosificación basados en los niveles relativos del anticuerpo o anticuerpos en la muestra de ensayo y la muestra de control.

Los niveles más altos de anticuerpos en la muestra de ensayo respecto a la muestra de control indican la selección de un agente terapéutico y un régimen de dosificación que es la administración subcutánea de interferón beta (BETAFERON[®], AVONEX[®], REBIF[®]) o la administración subcutánea de acetato de glatirámico (COPAXONE[®]).

30 El sujeto puede ser una mujer o un hombre.

La invención también proporciona un kit para diagnosticar síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El kit incluye un primer reactivo que detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc(α), un segundo reactivo que detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) y indicaciones para usar el kit. El kit incluye opcionalmente un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo de tipo IgM.

Dentro de la invención también están los sustratos que incluyen reactivos que detectan específicamente los anticuerpos descritos en el presente documento, p. ej., un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-Glc(β), un anticuerpo anti-Gal(β); un anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-L-Araf(α), un anticuerpo anti-L-Rha(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-4)GlcNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-GlcA(β) o un anticuerpo anti-GlcA(β) o un anticuerpo anti-Xyl(α). El sustrato puede ser, p. ej., plano.

Además se describe un procedimiento para seleccionar un agente terapéutico para tratar la esclerosis múltiple. El procedimiento incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto diagnosticado con, o con riesgo de esclerosis múltiple y determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo anti-Glc(α). Los niveles del anticuerpo en la muestra de ensayo se comparan con los niveles de anticuerpo en la muestra de control que consiste en uno o más individuos cuya gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple se conoce. Se selecciona un agente terapéutico y un régimen de dosificación basados en los niveles relativos del anticuerpo en la muestra del sujeto y la muestra de control.

El procedimiento incluye además determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) y comparar los niveles del anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en la muestra de ensayo con los niveles de anticuerpo en una muestra de control que consiste en uno o más individuos cuya gravedad de la enfermedad esclerosis múltiple se conoce.

La muestra de control consiste en uno o más individuos cuyo estado no es esclerosis múltiple o esclerosis múltiple estable.

Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado como lo entiende normalmente una persona experta en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En el caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el árbol de decisión para determinar que un paciente que se sospecha que tiene EM tiene realmente EM.

La Fig. 2 muestra el árbol de decisión para seleccionar un fármaco y dosis para un paciente con EM basado en los niveles de anticuerpos anti-Glc(α 1-4)Glc(α) o anti-Glc(α).

La Fig. 3 muestra el árbol de decisión para la predicción y un diagnóstico precoz de ataques en pacientes con EM.

La Fig. 4 es una Tabla que muestra la fluorescencia relativa de la unión de diferentes anticuerpos antiglucanos en pacientes con EM así como en individuos normales. Las estructuras de glucanos se presentan en la línea superior de la Tabla en sintaxis de LINEARCODE®.

La Fig. 5 muestra la señal media y mediana para los anticuerpos antiglucanos contra diferentes glucanos de sueros extraídos de pacientes con EM frente a sueros de control normales. Las estructuras de glucanos se presentan en sintaxis de LINEARCODE®.

La Fig. 6 es una gráfica que muestra las diferencias entre las señales medias de individuos con EM y sanos, las barras representan la desviación típica. Las estructuras de glucanos se presentan en sintaxis de LINEARCODE®.

La Fig. 7A es una gráfica que muestra la señal media de la unión de IgM anti-Glc(α) (Glucano nº 11) y Glc(α 1-4)Glc(α) (Glucano nº 12) en poblaciones con EM y sanas.

La Fig. 7B es una gráfica que muestra la señal media de la unión de IgM anti-Glc(α) (Glucano nº 11) y Glc(α 1-4)Glc(α) (Glucano nº 12) en poblaciones de pacientes con EM con ataque, pacientes con EM estables y sanos.

La Fig. 8 es una gráfica que muestra la correlación entre la fluorescencia relativa de la adhesión de anticuerpos IgM anti-glucosa alfa en muestras de pacientes con EM positivos para anti-Glc(α) (cuadro izquierdo), pacientes con EM negativos (cuadro derecho) y sus niveles de EDSS.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra la estabilidad temporal de la señal de la unión de anticuerpos antiglucanos IgM, IgG e IgA a lo largo de 13 semanas en 7 individuos sanos.

La Fig. 10A-10B muestran la ordenación del glucano; estructura química, especificidad de la interacción con lecitina y reproducibilidad. La Fig. 10A muestra un p-amino-fenil- β -sacárido covalentemente unido por su extremo reductor a una superficie sólida mediante un conector.

La Fig. 10B muestra la reproducibilidad de un lote a otro de la unión de WGA biotinilado a la cadena de glucano. Se ensayaron simultáneamente tres lotes separados de matrices con WGA biotinilado.

La Fig. 10C muestra un ensayo de competición con ConA para unir Man(α). Se incubaron concentraciones crecientes de Manosa o Gal(β 1-4)Glc solubles con ConA biotinilado (1,5 μ g/ml) durante 1 h, y se detectaron con Estreptavidina conjugada con Europio.

La Fig. 10D muestra la especificidad de la unión de la lecitina a diferentes anómeros. Unión de ConA al control negativo de glicerol (19), Man(α) (26) y Man(β) (27). Unión de GSI a -Gal(α) (1), Gal(β) (2), GalNAc(α) (7), y GalNAc(β) (8).

La Fig. 10E muestra la reproducibilidad de una placa a otra de la matriz de glucanos. Se pusieron sondas con WGA biotinilado en 5 placas idénticas que presentaban GlcNAc(β).

La Fig. 11 muestra el perfil de unión de glucanos de una población humana sana. Unión de anticuerpo anti-carbohidrato a variados glucanos (véase la Tabla 5 para las estructuras de los glucanos) en muestras de suero de 72 individuos medido con Proteína A biotinilada. Cada punto representa la media de dos experimentos, cada uno hecho por cuadruplicado. La caja incluye señales de 50% de la población. Las líneas gruesas y finas en la caja representan los valores medio y mediano, respectivamente. El límite de la caja más cercano a cero indica el percentil 25, y el borde de la caja más lejano de cero indica el percentil 75. Los bigotes encima y debajo de la caja indican los percentiles 90 y 10. El nivel de señal no específica medido se definió empíricamente; los glucanos contra los cuales se encontró que los niveles de anticuerpo eran relativamente bajos y muy variables entre experimentos se designaron para definir el nivel de fluorescencia de fondo (no se muestra). Se calculó el valor de la señal media para estos glucanos y se restó de la señal obtenida para cada muestra de suero y glucano particular. La fluorescencia de fondo media era 3×10^5 URF (unidades relativas de fluorescencia). TBST es una solución salina tamponada Tris con Tween 20 (véase el protocolo experimental).

La Fig. 12 muestra las señales de sueros individuales frente a una serie de glucanos. La unión del anticuerpo anti-glucano medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) se transformó usando un procedimiento de tipo ecualización de histograma que usa una cartografía monotónica, no lineal. De este modo, los valores de URF se reasignaron a un intervalo entre 0 (azul) y 255 (rojo). Los datos se agruparon usando un algoritmo de templado simulado.

La Fig. 13A-13C muestran el perfil de afinidad de unión de los anticuerpos purificados (A) anti-L-Rha(α), (B) anti-GlcNAc(α) y anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β) y (C) anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β) y anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β) a una matriz de 33 glucanos. Las estructuras de glucanos se describen en la Tabla 5. La cantidad de anticuerpo unido se midió usando anticuerpo IgG anti-humano de cabra biotinilado.

Las Figs. 14A y 14B muestran la especificidad del anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β). (A) Inhibición competitiva de la unión del anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β). Inhibición de la unión de afinidad del anticuerpo purificado anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β) a p-amino-fenil- β -Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β) inmovilizado en la superficie del pocillo, en función de la concentración de Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc o Gal(β 1-4)Glc. La cantidad de anticuerpo unido se midió usando anticuerpo IgG anti-humano de cabra biotinilado. (B) Unión de los anticuerpos anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β) (A) y anti-L-Rha(α) (B) a su sacárido cognado después de incubación con celulosa cristalina o amorfa. La cantidad de anticuerpo unido se midió usando anticuerpo IgG anti-humano de cabra biotinilado.

Las Figs. 15A-15C son representaciones gráficas de las uniones de los isotipos IgG, IgA e IgM de individuos sanos a los glucanos indicados.

La Fig. 16A es una representación de la matriz de glucanos usada para examinar los sueros de pacientes con aterosclerosis que padecen angina inestable o estable. Los glucanos contra los cuales se midieron niveles de anticuerpos significativamente diferentes en los diferentes grupos de pacientes se marcan con cuadrados negros. Los glucanos se listan en la Tabla 4.

La Fig. 16B es una representación gráfica que muestra los niveles de anticuerpos contra los glucanos n° 2 y n° 29 en tres grupos de pacientes; inestables, estables y no ateroscleróticos. La caja incluye señales de 50% de la población. Las líneas gruesas y finas en la caja representan los valores medio y mediano, respectivamente. El límite de la caja más cercano a cero indica el percentil 25 y el límite de la caja más lejano de cero indica el percentil 75. Los bigotes por encima y debajo de la caja indican los percentiles 90 y 10.

La Fig. 17 es un histograma que muestra el número de muestras en los tres grupos de pacientes positivos para los anticuerpos anti-IgA contra el glucano n° 2 y glucano n° 29.

La Fig. 18A es un histograma que muestra la distribución de los niveles de anticuerpos contra los glucanos n° 2 y n° 15 en los tres grupos de pacientes. La caja incluye señales de 50% de la población. Las líneas gruesas y finas en la caja representan los valores medio y mediano, respectivamente. El límite de la caja más cercano a cero indica el percentil 25 y el límite de la caja más lejano de cero indica el percentil 75. Los bigotes por encima y debajo de la caja indican los percentiles 90 y 10.

La Fig. 18B es un histograma que muestra el número de muestras en los tres grupos de pacientes positivos para los anticuerpos anti-IgA contra el glucano n° 2 o el glucano n° 15.

La Fig. 19 es una representación gráfica de la especificidad y sensibilidad basados en los niveles de anticuerpos anti-IgA contra el glucano n° 2, el glucano n° 15, el glucano n° 17 y el glucano n° 49. A - aterosclerosis; S - estable; US - inestable; NA - no aterosclerosis.

La Fig. 20 es un histograma que muestra el perfil de unión de células CD4+ de un solo individuo a diferentes glucanos. Las estructuras de glucanos se representan en sintaxis de LINEARCODE®.

La Fig. 21A es una gráfica que muestra la fluorescencia relativa mediana para las células CD4+ de cada uno de siete individuos a las estructuras de glucanos representadas en sintaxis de LINEARCODE®.

La Fig. 21B muestra las señales de los sueros individuales contra una serie de glucanos. La unión del anticuerpo antiglucano medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) se transformaron usando un procedimiento de tipo ecualización de histograma que usa una cartografía monotónica, no lineal. De esta forma, los valores de URF se reasignaron a un intervalo entre 0 (azul) y 255 (rojo). Los datos se agruparon usando un algoritmo de templado simulado.

Descripción detallada de la invención

Los procedimientos proporcionados en la presente invención permiten el diagnóstico precoz de la esclerosis múltiple inicial y recurrente usando niveles de biomarcadores evaluados de forma objetiva. El árbol de decisión actual para el diagnóstico de un paciente con EM se describe en la Fig. 1. Un paciente con un empeoramiento agudo de la función neurológica debe ser diagnosticado inicialmente como un paciente con EM confirmada antes de poder ser elegido para un tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad. El médico deberá determinar si el paciente

tiene síntomas parecidos a los de la EM (tales como accidente cerebrovascular en joven, lupus, deficiencia de vitamina B-12, síndrome anti-fosfolípido, migraña grave) o si realmente tiene EM. El paciente tendrá que experimentar un segundo empeoramiento agudo de la función neurológica (ataque) antes de ser diagnosticado como un paciente con EM y poder empezar con el tratamiento crónico con un agente terapéutico para la EM tal como interferón beta o acetato de glatirámico.

Actualmente, los médicos están usando la IRM para identificar la existencia de lesiones cerebrales y/o ensayando las bandas oligoclonales (BOC) en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Si la IRM da un resultado claro relacionado con la existencia de lesiones cerebrales o la presencia de BOC en el LCR, el médico puede iniciar el tratamiento inmediatamente con el fin de prevenir lesiones cerebrales silenciosas. Actualmente un diagnóstico de EM completo sólo se hace después del segundo ataque. En el caso de que la IRM no de un resultado claro o no haya BOC en el LCR de los pacientes, no se diagnostica EM y el tratamiento se retrasa hasta después de un segundo ataque.

El procedimiento descrito en el presente documento se puede realizar extrayendo sangre de un paciente con empeoramiento agudo de la función neurológica y que se sospecha que tiene EM. El procedimiento puede identificar la existencia de EM midiendo el nivel de IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α). Si el nivel de al menos uno de estos anticuerpos es significativamente mayor que el nivel medio de estos anticuerpos en el suero de individuos sanos, el paciente se diagnostica como un paciente con EM sin necesidad de esperar un segundo ataque. Además, el diagnóstico rápido permite que el tratamiento empiece inmediatamente.

Una primera línea del tratamiento para la EM es el interferón β (p. ej., INF β -1a e INF β -1b). La evaluación actual de la eficacia y la dosificación requerida del fármaco se basa en el seguimiento continuado de varias puntuaciones clínicas. Actualmente, la puntuación de EDSS y su cambio con el tiempo (p. ej., comparando la diferencia de la EDSS cada 3-6 meses) es el parámetro clínico principal para la gestión de la enfermedad. Un componente importante de la evaluación es el nivel de fatiga y depresión experimentados por el paciente. La fatiga y/o depresión pueden ser un síntoma de la EM, como enfermedad autoinmune, o un efecto secundario del uso de interferón beta. Identificar la causa de la fatiga es importante para gestionar el tratamiento. Por ejemplo, si la fatiga es un resultado de un efecto secundario del interferón, el médico tendrá que considerar la disminución de la dosificación o incluso el cambio por otro fármaco. Sin embargo, si la fatiga se debe a los síntomas de la EM, el médico tendrá que considerar el aumento de la dosificación de fármaco (véase la Figura 2).

El cribado de la sangre del paciente y la determinación del nivel de biomarcadores descritos en el presente documento, p. ej., los anticuerpos IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) del presente documento, permite el seguimiento preciso de la terapia. Las disminuciones significativas de los niveles de anticuerpos indican que el paciente está respondiendo bien al fármaco dado.

Detección precoz de los ataques

Actualmente no hay forma de predecir la aparición de ataques en los pacientes con EM. La IRM y la evaluación clínica de los pacientes sólo pueden poner de manifiesto el daño que ya se ha producido. La medición periódica del nivel de algunos anticuerpos antiglicanos (por ejemplo IgM anti-Glc(α) o IgM anti Glc(α 1-4)) en la sangre de los pacientes de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento, permite que los médicos identifiquen ataques que van a venir basándose en un aumento de los niveles de estos anticuerpos. Los niveles de estos anticuerpos son significativamente mayores en la sangre de pacientes con situaciones de ataques de EM frente a pacientes en un estado estable (véase la Fig. 7). Tras la detección de un aumento de estos anticuerpos, el médico puede iniciar un tratamiento agresivo con esteroides para reducir la inflamación y prevenir el daño a la mielina (véase la Fig. 3).

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para identificar y evaluar individuos con aterosclerosis con riesgo de angina estable e inestable, usando anticuerpos biomarcadores específicos para glucanos, así como el uso de glucanos inmovilizados para detectar células de interés.

En esta solicitud se discuten diferentes estructuras de glucanos. Los glucanos se presentan en la forma condensada de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUAC) para la nomenclatura y representación de carbohidratos o en la sintaxis de LINEARCODE®, para los principios de la sintaxis de LinearCode (Véase Banin E. Neuberger Y. Altshuler Y. Halevi A. Inbar O. Dotan N. and Dukler A. (2002) "A Noval Liner Code Nomenclature for complex Carbohydrates". *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol. 14 No. 77 pp. 127-137). La traducción de la representación de LINEARCODE a IUPAC está en la Tabla 1. Todas las estructuras de glucanos que se discuten en esta descripción, salvo que se mencione lo contrario, están conectadas en la forma anomérica α o β indicada por el conector a una fase sólida como se describe en la Fig. 10A.

La invención se ilustrará en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Comparación entre anticuerpos antiglucanos en el suero de pacientes con esclerosis múltiple (EM) y de población normal

Se obtuvo un perfil de anticuerpos antiglucanos (Igs) usando matrices de GlycoChip® (Glycominds, Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100). Las matrices se construyeron usando procedimientos descritos en el documento WO00/49412. Se compararon los perfiles de anticuerpos antiglucanos de 40 pacientes con esclerosis múltiple y 40 donantes de sangre normales de sexo y edades acorde con los anteriores.

Todas las muestras de suero se ensayaron usando placa GlycoChip® (Glycominds Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100), que era una matriz de mono y oligosacáridos unidos covalentemente a una placa de microvaloración de 384 pocillos de volumen reducido. Los mono y oligosacáridos presentados en la matriz se listan en la Fig. 4. En la Tabla 1 se puede encontrar una traducción de la sintaxis de LinearCode™ usada para describir la estructura de glucanos a la nomenclatura IUPAC.

El suero de los voluntarios sanos y los pacientes voluntarios con EM que habían firmado un consentimiento informado, se recogieron en tubos que contenían gel, revestidos de silicona y al vacío (Estar Technologies n° cat. 616603GLV). Se separó el suero de las células sanguíneas y se mantuvo congelado a -25°C hasta su uso. Se analizaron en dos experimentos separados, cada uno repetido dos veces en días separados.

Los sueros de los voluntarios se diluyeron (1:20) en TBST dispensado en una placa GlycoChip® usando un robot Tecan Genesis Workstation 200 (10 µl/pocillo) y se incubaron 30 min a 25°C. Había 4 repeticiones para cada glucano y muestra de suero en la placa.

Las placas se lavaron con 250 µl/pocillo de tampón de alta concentración salina (KNa 0,15 M pH 7,2, NaCl 2 M, MgSO₄ 0,085 M, Tween 20 al 0,05%) en un lavador de placa automático (Tecan, PowerWasher™). Se dispensaron manualmente 10 µl/pocillo de proteína A biotinilada (ICN 62-265), en TBST 1 µg/ml, y las placas se incubaron durante 30 min a 25°C. La placa se lavó otra vez con tampón de alta concentración salina.

Se añadió manualmente europio conjugado con estreptavidina, Wallac, AD0062 (1 µl/ml, 10 µl/pocillo) seguido de una incubación durante 30 min a 25°C en la oscuridad. Se repitió el lavado de las placas con tampón de alta concentración salina. Se añadió tampón de potenciación Delfia™ (Wallac, 730232, 10 µl/pocillo) a los pocillos y las placas se incubaron al menos 30 min en la oscuridad. Se leyó la fluorescencia de los pocillos con Victor 1420 (Wallac) usando los ajustes de fluorescencia resuelta en el tiempo Emi. 612 nm y Exc. 340 nm.

Los perfiles de todos los pacientes ensayados se muestran en la Fig. 4. Las 40 líneas superiores (EM) describen el nivel de anti-carbohidratos de las muestras de EM, y las 40 líneas inferiores (CN) describen el nivel de anti-carbohidrato de muestras de población de control normal. Los valores presentados son valores absolutos sin reducción del valor de fondo. Puesto que la detección de anticuerpos unidos se hizo con proteína A biotinilada, que se une a IgG, IgA e IgM, la señal representa la unión total de los anticuerpos de todos los subtipos IgG, IgA e IgM.

Una comparación entre los valores medio y mediano de los anticuerpos anti-carbohidratos en las poblaciones con EM y normal pone de manifiesto diferencias significativas entre las muestras de los pacientes con EM y las muestras de la población normal, véase la Fig. 5. Un ejemplo de una diferencia principal observada entre los dos grupos es la señal media contra el glucano Ga4Gb. Un ensayo t mostró que la diferencia es estadísticamente muy significativa ($\alpha=0,05$; $p<0,001$). Otro ejemplo es Ab3(GNb6)ANa ($\alpha=0,05$; $p<0,001$). Hay diferencias significativas entre las medianas de las señales de población con EM y normal en relación con los anticuerpos unidos a los siguientes glucanos: Glc(α), Glc(α 1-4)Glc(α), Glc(α 1-4) Glc(β), Glc(β), Gal(β), Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), GlcNAc(β 1-4) GlcNAc(β), L-Araf(α), L-Rha(α), Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), Gal(β 1-4)GlcNAc(α), Gal(β 1-3)GalNAc(α), Gal(β 1-3) GlcNAc(β), GlcA(β), GlcA(β), Xyl(α). La señal de los anticuerpos unidos en el grupo de EM es mayor que la señal en el grupo de control normal.

La Fig. 6 presenta la diferencia entre los valores de unión medios de anticuerpos antiglucanos entre las poblaciones.

Ejemplo de referencia 2

Diferencias en los niveles de anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α), anticuerpos IgM, en el suero entre pacientes con EM en ataque, pacientes con EM estable y población sana

Se usó una matriz de glucanos para buscar biomarcadores entre el repertorio de anticuerpos de unión a glucanos del suero humano para diferenciar entre una población sana y un grupo de pacientes con esclerosis múltiple (EM), y entre pacientes con EM en etapas de exacerbación y de remisión. Este ejemplo demuestra que se encuentran dos anticuerpos IgM, anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α), con niveles significativamente superiores en pacientes con EM que en gente sana (sensibilidad de 60% y 93%, respectivamente, y en pacientes con EM en una etapa de exacerbación con respecto a pacientes en una etapa de remisión (sensibilidad y especificidad de 89% y 71%, respectivamente).

También se proporciona un perfil de anticuerpos antiglucanos para una población sana, que incluye un intervalo de variación durante un intervalo de 13 semanas.

La estabilidad temporal del perfil de los anticuerpos antiglucanos a lo largo de 13 semanas en individuos aparentemente sanos era alta. Los niveles bajos de IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en una población normal, y sus niveles altos en pacientes de EM, y la alta estabilidad temporal de anticuerpos antiglucanos sugiere que estas IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) pueden servir como biomarcador para el diagnóstico precoz, la prescripción temprana de fármacos, el seguimiento de los efectos del fármaco y la detección precoz de ataques.

Todas las muestras de suero se ensayaron usando GlycoChip® (Glycominds Ltd., Lod, Israel). Los glucanos se unieron covalentemente a la superficie de plástico por un espaciador como se ha descrito previamente (documento WO 02/064556). En la Tabla 1 se proporciona una lista que describe los mono y oligosacáridos ensayados.

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes de sangre aparentemente sanos en un protocolo de consentimiento informado aprobado por los comités éticos de estudios humanos de Helsinki del Belinson Medical Center en Tel-Aviv, Israel, y el Carmel Medical Center en Haifa, Israel. Se recogieron muestras de sangre de pacientes con EM admitidos en el Multiple Sclerosis Clinic en el Carmel Medical Center en Haifa, Israel. Las muestras de sangre se recogieron en tubos recubiertos de silicona al vacío que contenían gel para la separación del suero del coágulo de sangre (Estar Technologies). Después de la coagulación de la sangre, el suero se separó por centrifugación y se recogió. Las muestras se almacenaron congeladas a -25°C hasta su uso.

El volumen de todas las soluciones añadidas a la matriz de glucanos era 10 μ l/pocillo. Los sueros se diluyeron (1:20; concentración de saturación) en Tris-HCl 0,15 M pH 7,2, MgSO₄ 0,085 M, Tween 20 al 0,05% (TBST) que contenía BSA al 1% (Sigma), se dispensaron en las placas de matrices de glucanos usando un sistema de manejo automático Tecan Genesis Workstation 200, y se incubaron durante 60 min a 37°C. Después las placas se lavaron con 250 μ l/pocillo de solución salina tamponada de fosfato con Tween 20 al 0,05% (PBST, Sigma) en un lavador de placa automático (Tecan, PowerWasher™). En este punto se añadieron los siguientes reactivos, diluidos en TBST con BSA al 1%, usando un dispensador Multidrop 384 (Thermo Labsystems) y se incubaron durante 60 min a 37°C: para la determinación de IgG, IgA e IgM - la respectiva subclase específica del anticuerpo Ig anti-humano de cabra biotinilado (Jackson, PA, EE.UU.) con 2,8 μ g/ml, 3 μ g/ml y 0,9 μ g/ml, respectivamente; para la determinación total de Ig - Proteína A biotinilada (1 μ g/ml, ICN Biomedicals). Después del lavado con PBST, se añadió europio conjugado con estreptavidina (0,1 μ g/ml) diluido en TBST con BSA al 1% a cada pocillo seguido de una incubación durante 30 min a 37°C en la oscuridad, y se lavó con PBST. Después se añadió la solución de potenciación Delfia™ a los pocillos y las placas se incubaron durante 30 a 45 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia de los pocillos se leyó con un lector de placas Victor 1420 (Wallac, Finlandia) usando los parámetros de fluorescencia resuelta en el tiempo de 340/612 nm (Excitación/Emisión).

Diferencias en los niveles de anticuerpos IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en el suero entre pacientes con EM en ataque, pacientes con EM estable y población sana

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes con EM admitidos en un ambulatorio para el examen regular después de firmar los formularios de consentimiento informado. El grupo de pacientes era 80% mujeres, lo que reflejaba aproximadamente la relación de género en la población general con EM. De acuerdo con los datos publicados (Ritchie y col., *J. Clin. Lab. Anal.* 12:363-70, 1998), se observaron niveles significativamente superiores de IgM (pero no de IgG ni de IgA) en los sueros tanto de mujeres sanas como con EM, comparado con hombres (no se muestra). Por lo tanto, el análisis se limitó a subpoblaciones de mujeres sanas y con EM. Los sueros de los pacientes con EM se cribaron primero con 54 glucanos (Tabla 1) para la presencia de anticuerpos antiglucanos IgG, IgM e IgA, con el propósito de identificar marcadores que confirmarían los pacientes con sólo sucesos de desmielinización aguda en el entorno de la EM, y marcadores que distinguirían entre pacientes durante las etapas de exacerbación y remisión de la enfermedad. El experimento se repitió dos veces usando 5 de los 54 glucanos entre los cuales se encontraron algunas diferencias entre los grupos en la ronda inicial.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa y reproducible en los niveles de anticuerpos IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) entre los grupos sanos y con EM (Fig. 7A), pero no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgG o de IgA en estos estudios (no se muestra). En los sueros de ambos grupos de pacientes con EM los niveles de IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) eran significativamente superiores que en la población sana. Se usó un valor discriminante óptimo fijado de forma arbitraria (la señal del percentil 97% de la población “sana”) para identificar las muestras positivas por encima, y las muestras negativas por debajo, del valor discriminante. Así pues, las señales de unión de anti-Glc(α) identificaron correctamente 19 de 42 muestras de EM (45% de sensibilidad) y 42 de 44 muestras de sueros aparentemente sanas (96% de especificidad). La medición de la unión de anti-Maltosa identificó correctamente 48% de los sueros de EM y 95% de las muestras de sueros aparentemente sanas. Definiendo como positiva una muestra cuya señal está por encima del valor discriminante en los ensayos de anti-Glc(α) o de anti-Glc(α 1-4)Glc(α), mejora la sensibilidad al 60% y deja la especificidad en 93% (Tabla 2). La distribución diferencial de anticuerpos anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en pacientes durante las etapas de exacerbación y remisión de la enfermedad tenía niveles significativamente superiores en el primer grupo (Fig. 7B). No se encontró diferencia entre los pacientes no tratados o pacientes tratados con interferón β (no se muestra). Usando como un valor discriminante el percentil 80 de la población con EM “estable”, se determinó que las señales de unión de anti-Glc(α) identificaban correctamente 15 de 18 muestras de “ataque” (83% de sensibilidad), 19 de 24 muestras “estables” (79% de especificidad).

ciudad referido a estable como sin síntomas), y 42 de 44 muestras “sanas” (95% de especificidad). La medición de la unión de anti-Maltosa identificaba correctamente 72% de los sueros de ataque, 79% de los sueros “estables” y 97% de los “sueros sanos”. La definición como positiva de una muestra cuya señal está por encima del valor discriminante en cualquiera de los ensayos de Glc(α) o de Maltosa, da como resultado una sensibilidad de 89% y especificidad de 71% y 95% respecto a las muestras “estables” o “sanas”, respectivamente (Tabla 3). La alta especificidad y sensibilidad de los anticuerpos IgM anti-Glc(α) y anti-Glc(α 1-4)Glc(α) los hace una herramienta eficaz para el diagnóstico precoz y definición de pacientes con EM. El hecho de que los niveles de estos anticuerpos en la situación de ataque de EM sean mucho más altos que en la situación estable los hace una herramienta para la identificación temprana y predicción de ataques en pacientes con EM reincidente-remitente.

Se observó una correlación alta entre niveles en el suero de anticuerpo IgM anti-Glc(α) en pacientes mujeres diagnosticadas clínicamente con EM (reincidente-remitente), que se definieron positivas por tener un anticuerpo IgM anti-Glc(α) (como se ha descrito antes), y la puntuación EDSS (Escala Ampliada del Estado de Discapacidad) de mujeres, véase la Figura 8, cuadro izquierdo. No había correlación entre la EDSS y los niveles del anticuerpo anti-Glc(α) en sueros de pacientes mujeres diagnosticadas clínicamente con EM (reincidente-remitente), que se definieron negativas por tener el anticuerpo IgM anti-Glc(α), véase la Figura 8, cuadro izquierdo. La alta correlación indica que los niveles de IgM anti-Glc(α) en el suero pueden actuar como biomarcador molecular indirecto para evaluar la actividad de la enfermedad.

Intervalo temporal de niveles de anticuerpo antiglucano

Cuando se considera cualquier parámetro biológico para usar como un biomarcador indirecto, evidentemente un requisito previo es que el biomarcador no sea variable en el tiempo en la población normal. Así pues, se hizo el seguimiento de los niveles en el suero de anticuerpos IgG, IgA, e IgM anti-L-Rha(α), anti-GlcNAc(α), y anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β) (β -Celotriosa) de 7 voluntarios sanos durante 13 semanas (Fig. 9). En general, se encontró que las concentraciones de anticuerpos en el suero variaban entre los diferentes individuos, pero eran bastante estables a lo largo del tiempo. Por ejemplo, los sueros n° 9161 y n° 9162 tienen niveles relativos extremadamente altos y temporalmente estables de los anticuerpos IgA anti-GlcNAc(α) y anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), respectivamente, pero niveles relativamente normales de anticuerpos IgA anti-L-Rha(α) y anticuerpos IgG e IgM. Cuando se producen cambios en el nivel de anticuerpos normalmente son graduales y continúan a lo largo de varias semanas (p. ej., suero n° 9162; IgA anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β)), pero también pueden ser repentinos, p. ej., suero n° 9172; IgM anti-L-Rha(α), que aumenta de repente entre la semana cuatro y cinco y después vuelve lentamente a su nivel básico.

Ejemplo 4

Perfil de anticuerpos antiglucanos (AGAP) en una población humana normal

Se determinó la unión de anticuerpos Ig totales (detectado con Proteína A) de los sueros de 72 individuos a 34 mono y oligosacáridos (Figura 11 y Tabla 5), y la unión de IgG, IgA e IgM de 200 sueros a 6 mono y oligosacáridos (Figura 15A-C). Las señales más fuertes se registraron para los anticuerpos contra GlcNAc(α) y L-Rha(α), mientras que se observaron niveles menores contra los oligosacáridos de glucosa unidos por enlaces β -4, GlcNAc(β), GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), Gal(α) y Gal(α 1-3)Gal(β 1-4) GlcNAc(β). Esto está de acuerdo con los datos previamente publicados que muestran la distribución de anticuerpos antiglucanos en un banco de sueros humanos disponibles comercialmente (Documento WO 02/064556). Los AGAP (perfiles de anticuerpos antiglucanos, por sus siglas en inglés) de las subclases IgG e IgA eran similares a los AGAP de las Ig totales, mientras que los de IgM eran menores y más uniformes entre los diferentes glucanos. Los anticuerpos antiglucanos de la población tendían a ajustarse a una distribución logarítmica normal, véase la Fig. 15A-15C. Es evidente que existe una variación considerable en los niveles de anticuerpos antiglucanos entre individuos dentro de la población examinada, un hecho que sugiere la existencia de AGAP individuales, pero limita la búsqueda de marcadores a anticuerpos antiglucanos presentes en cantidades bajas.

También se han usado glucanos inmovilizados sobre perlas de afinidad para purificar anticuerpos contra oligosacáridos de glucosa unidos por enlaces β 4, y L-Rha(α). Su perfil de unión y la especificidad se describen en las Figuras 13, 14A y 14B.

Ejemplo de referencia 8

Uso de anticuerpos antiglucanos para diferenciar entre pacientes con aterosclerosis de alto riesgo con placas vulnerables y pacientes de aterosclerosis con bajo riesgo con placas estables

Se compararon los niveles de anticuerpos antiglucanos en los sueros de pacientes con aterosclerosis con placas vulnerables, con los niveles de anticuerpos de glucanos en el suero de pacientes con aterosclerosis con placas estables, así como de individuos sin aterosclerosis.

La aterosclerosis es una causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Es un trastorno sistémico de las paredes de los vasos sanguíneos que conduce al desarrollo de placas ateroscleróticas en las paredes

de los vasos sanguíneos. Algunas de estas placas más tarde se vuelven vulnerables a la rotura produciendo coágulos de sangre que conducen a ataques cardíacos o accidentes cerebrovasculares.

Los componentes principales de las placas ateroscleróticas son proteoglucanos, lípidos, células musculares y leucocitos (células T y macrófagos). Además, la aterosclerosis se percibe como una enfermedad autoinmune en la que uno de sus iniciadores es la reactividad cruzada entre anticuerpos contra antígenos bacterianos y los antígenos en las paredes de los vasos sanguíneos.

Un punto importante en el desarrollo de la aterosclerosis es el cambio de placas estables (PE), que se asocian con riesgo bajo, a placas vulnerables (PV) inflamadas, que se asocian con riesgo alto. La diferenciación entre las PE y PV es clínicamente problemática, ya que sólo se puede hacer una distinción concluyente mediante una autopsia *post-mortem*.

Las muestras de suero fueron suministradas por el Dr. Jacob George del departamento de cardiología en el Tel Aviv Medica Center, Israel. Todos los pacientes eran hombres no diabéticos con un intervalo de edades de 30 a 69. Se ensayaron 39 muestras de suero de pacientes de los siguientes tipos:

Angina inestable - 13 pacientes con aterosclerosis caracterizados por tener síndromes coronarios agudos (infartos de miocardio con ondas Q o sin ondas Q). Se considera que ambos se desarrollan a partir de la rotura de placas vulnerables. Los miembros del grupo de angina inestable incluían pacientes con síndrome coronario agudo admitidos con dolor en el pecho y cambios en el ECG o elevación del marcador cardíaco. Se quejaban de la aparición reciente (<3 días) de angina y se sometieron al seguimiento telemétrico del electrocardiograma (ECG) continuado durante la admisión. Se detectó al menos una angina de reposo o un episodio que duró más de 20 min durante las últimas 48 h, junto con un aumento de la creatina quinasa, niveles de MB o niveles de troponina. Los miembros de este grupo se habían sometido a angiografía (cateterización), la cual documentaba la presencia de aterosclerosis coronaria.

Angina estable - 13 pacientes con aterosclerosis se caracterizaban por tener angina estable. Los miembros del grupo de angina estable se habían sometido a angiografía (cateterización) que documentaba la presencia de aterosclerosis coronaria. No se detectaron cambios en el ECG, ni se detectaron aumentos en la creatina quinasa, niveles de MB o niveles de troponina.

Sin placas - 13 pacientes con arterias coronarias normales. Los miembros del grupo de "sin placas" no mostraban pruebas de aterosclerosis coronaria después de cateterización.

Se obtuvo un perfil de anticuerpos antiglucanos usando matrices de GlycoChip™ (Glycominds, Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100) construidas usando procedimientos descritos en el documento WO 00/49412. Todas las muestras de suero se ensayaron usando placas de GlycoChip™ (Glycominds, Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100), que contenían una matriz de mono y oligosacáridos covalentemente unidos en una placa de microvaloración de 384 pocillos de volumen reducido. En la Tabla 4 se describe la lista de mono y oligosacáridos presentados en la matriz, así como sus números de serie.

Los sueros se diluyeron (1:20) en TBST, se dispensaron en una placa GlycoChip™ usando una robot Tecan Genesis Workstation 200 (10 µl/pocillo) y se incubaron 30 min a 25 grados Celsius. Cada muestra de glucano y suero en la placa se ensayó 8 veces.

Las placas se lavaron con 250 µl/pocillo de tampón de alta concentración salina (KNa 0,15 M pH 7,2, NaCl 2 M, MgSO₄ 0,058 M, Tween 20 al 0,05%) en un lavador de placa automático (Tecan, PowerWasher™). Se dispensaron manualmente 10 µl/pocillo de IgG, IgM o IgA antihumana de cabra biotinilada (Jackson, PA, EE.UU.), 1 µg/ml en TBST, y las placas se incubaron durante 30 min a 25°C. La placa se lavó otra vez con tampón de alta concentración salina.

Se añadió manualmente europio conjugado con estreptavidina, Wallac, AD0062 (1 µl/ml, 10 µl/pocillo) seguido de una incubación durante 30 min a 25°C en la oscuridad. Se repitió el lavado de las placas con el tampón de alta concentración salina. Se añadió tampón de potenciación Delfia™ (Wallac, 730232, 10 µl/pocillo) a los pocillos y las placas se incubaron al menos 30 min en la oscuridad. Se leyó la fluorescencia de los pocillos con Victor 1420 (Wallac) usando los ajustes de fluorescencia resuelta en el tiempo Emi. 612 nm y Exc. 340 nm.

La señal de unión de glucano obtenida para el grupo "sin placa" se usó para calcular los valores discriminantes para cada glucano por encima de los cuales se consideraba que los pacientes eran positivos. Estos valores discriminantes se definieron como la señal media del grupo "sin placa" más una o dos desviaciones típicas. De acuerdo con esta definición, se identificaron una serie de glucanos que tenían algún grado de poder de separación entre los grupos de pacientes (véase a continuación). La "separación" basada en un glucano determinado se definió como al menos 50% (7/13) muestras positivas en los grupos de "angina inestable" o "angina estable", y 2 o menos muestras positivas en el grupo "sin placa".

La Fig. 16A es una representación de la matriz de glucanos usada para examinar los sueros de los pacientes que padecen angina inestable o estable, las estructuras de glucanos se describen en la Tabla 4. Los glucanos contra los cuales se midieron niveles de anticuerpos significativamente diferentes en los diferentes grupos de pacientes se marcan

ES 2 297 248 T3

con cuadrados negros. Con el nivel del valor discriminante de la media más dos desviaciones típicas, la “separación” se consiguió con la unión de IgA a dos glucanos diferentes. Uno se separó entre los anticuerpos IgG, pero ninguno se separó entre los anticuerpos IgM.

5 A continuación se presentan los glucanos solos que dan las mejores separaciones:

Glucanos	Resultado	Angina inestable	Angina estable	Sin placa
Ab	Positivos	7	5	0
	Negativos	6	8	13
Fb	Positivos	1	9	1
	Negativos	12	4	12

20 Algunos glucanos que no se definieron como “separadores” todavía dieron algún grado de separación. Cuando se usaban en combinaciones, se podía mejorar la separación más que la de los glucanos solos. Los glucanos se presentan a continuación.

Glucanos LinearCode	Resultado	Angina inestable	Angina estable	Sin placa
Aa	positivos	6	2	0
	negativos	7	11	13
Xb	positivos	1	6	0
	negativos	12	7	13
Fa	positivos	5	3	1
	negativos	8	10	12
A[3S]b	positivos	1	6	1
	negativos	12	7	12
GNb4GNb	positivos	5	0	1
	negativos	8	13	12

50 La Fig. 16B es una representación gráfica que muestra niveles de anticuerpos contra los glucanos nº 2 y nº 29 en los tres grupos de pacientes. La caja incluye señales de 50% de la población. Las líneas gruesas y finas en la caja representan los valores medio y mediano, respectivamente. El límite de la caja más cercano a cero indica el percentil 25 y el límite de la caja más lejano de cero indica el percentil 75. Los bigotes encima y debajo de la caja indican los percentiles 90 y 10.

55 La Fig. 17 es un histograma que muestra el número de muestras en los tres grupos de pacientes positivas para anticuerpos anti-IgA contra el glucano nº 2 y el glucano nº 29.

60 La Fig. 18A es un histograma que muestra la distribución de los niveles de anticuerpos contra los glucanos nº 2 y nº 15 en los tres grupos de pacientes. La caja incluye señales de 50% de la población. Las líneas gruesas y finas en la caja representan los valores medio y mediano, respectivamente. El límite de la caja más cercano a cero indica el percentil 25 y el límite de la caja más lejano de cero indica el percentil 75. Los bigotes encima y debajo de la caja indican los percentiles 90 y 10.

65 La Fig. 18B es un histograma que muestra el número de muestras en los tres grupos de pacientes positivas para anticuerpos anti-IgA contra el glucano nº 2 y el glucano nº 15. En el nivel del valor discriminante de la media más una desviación típica, la “separación” se consiguió con la unión de IgA a 6 glucanos diferentes. Los niveles de anticuerpos IgG e IgM no eran diferentes en los tres grupos.

La separación obtenida con combinaciones se muestra a continuación (se usó Aa porque el número de muestras positivas en el grupo de “angina estable” era menor que usando Ab, mejorando de esta forma la separación en relación con el grupo de “angina inestable”):

Glucanos LinearCode	Resultado	Angina inestable	Angina estable	Sin placa
Aa y GNB4GNb	Positivo con uno de los glucanos	8	2	1
	Negativo con ambos	5	11	12
Aa y Ga4Ga	Positivo con uno de los glucanos	8	5	0
	Negativo con ambos	5	8	13

La especificidad y sensibilidad del ensayo para detectar la “angina inestable” usando Aa y GNB4GNb era por tanto 62% (8/13) y 88% (23/26), respectivamente.

Una combinación de tres glucanos, Aa, GNB4GNb y Fb hicieron posible determinar la especificidad también para el 75% (9/13) del grupo de “angina estable”. Esto surge a raíz del hecho de que Fb detecta en su mayor parte la “angina estable”. La especificidad y sensibilidad del ensayo combinado se resumen en la Fig. 19.

Estos resultados demuestran que se puede usar una combinación de glucanos (Gal(α), GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β) y Fu(β)) para distinguir satisfactoriamente entre las poblaciones de angina estable e inestable con una especificidad de 62% y sensibilidad de 88%. Estos resultados muestran que se puede desarrollar un biomarcador basado en anticuerpos IgA que se unen a glucanos que distinguen entre pacientes con angina inestable y estable.

Ejemplo de referencia 9

Uso de anticuerpos antiglucanos para diferenciar entre pacientes con aterosclerosis de alto riesgo con placas vulnerables y pacientes con aterosclerosis de bajo riesgo con placas estables

Se compararon los niveles de anticuerpos antiglucanos en los sueros de pacientes con aterosclerosis con placas vulnerables con los niveles de anticuerpos contra glucanos en el suero de pacientes con aterosclerosis con placas estables, así como de individuos sin aterosclerosis.

La aterosclerosis es una causa principal de morbilidad y mortalidad en países desarrollados. Es un trastorno sistémico de las paredes de los vasos sanguíneos que conduce al desarrollo de placas ateroscleróticas en las paredes de los vasos sanguíneos. Algunas de estas placas después se vuelven vulnerables a la rotura, produciendo coágulos de sangre que conducen a ataques al corazón y accidentes cerebrovasculares.

Los componentes principales de las placas ateroscleróticas son proteoglucanos, lípidos, células musculares y leucocitos (células T y macrófagos). Además, la aterosclerosis se percibe como una enfermedad autoinmune en la que uno de sus iniciadores es la reactividad cruzada entre anticuerpos contra antígenos bacterianos y los antígenos en las paredes de los vasos sanguíneos.

Un punto importante en el desarrollo de la aterosclerosis es el cambio de placas estables (PE), que se asocian con riesgo bajo, a placas vulnerables (PV) inflamadas, que se asocian con riesgo alto. La diferenciación entre las PE y PV es clínicamente problemática, ya que sólo se puede hacer una distinción concluyente mediante una autopsia *post-mortem*.

Las muestras de suero fueron suministradas por el Dr. Jacob George del departamento de cardiología en el Tel Aviv Medical Center, Israel. Todos los pacientes eran hombres no diabéticos con un intervalo de edades de 30 a 69. Se ensayaron 72 muestras de suero de pacientes de los siguientes tipos:

Angina inestable - 24 pacientes con aterosclerosis caracterizados por tener síndromes coronarios agudos (infartos de miocardio con ondas Q o sin ondas Q). Se considera que ambos se desarrollan a partir de la rotura de placas vulnerables. Los miembros del grupo de la angina inestable incluían pacientes con síndrome coronario agudo admitidos con dolor en el pecho y cambios en el ECG o elevación del marcador cardíaco. Se quejaban de la aparición reciente (<3 días) de angina y se sometieron al seguimiento telemétrico del electrocardiograma (ECG) continuado durante la admisión. Se detectó al menos una angina de reposo o un episodio que duró más de 20 min durante las últimas 48 h, junto con un aumento de la creatina quinasa, niveles de MB o niveles de troponina. Los miembros de este grupo se habían sometido a angiografía (cateterización), la cual documentaba la presencia de aterosclerosis coronaria.

ES 2 297 248 T3

Angina estable - 24 pacientes con aterosclerosis se caracterizaban por tener angina estable. Los miembros del grupo de angina estable se habían sometido a angiografía (cateterización) que documentaba la presencia de aterosclerosis coronaria. No se detectaron cambios en el ECG, ni se detectaron aumentos en la creatina quinasa, niveles de MB o niveles de troponina.

Sin placas - 24 pacientes con arterias coronarias normales. Los miembros del grupo de “sin placas” no mostraban pruebas de aterosclerosis coronaria después de cateterización.

Se obtuvo un perfil de anticuerpos antiglicanos usando matrices de GlycoChip™ (Glycominds, Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100) construidas usando procedimientos descritos en el documento WO 00/49412. Todas las muestras de suero se ensayaron usando placas de GlycoChip™ (Glycominds, Ltd., Lod, Israel, n° de cat. 9100), que contenían una matriz de mono y oligosacáridos covalentemente unidos en una placa de microvaloración de 384 pocillos de volumen reducido. En la Tabla 4 se describe la lista de mono y oligosacáridos presentados en la matriz, así como sus números de serie.

Los sueros se diluyeron (1:20) en TBST, se dispensaron en una placa GlycoChip™ usando una robot Tecan Genesis Workstation 200 (10 µl/pocillo) y se incubaron 30 min a 25 grados Celsius. Cada muestra de glucano y suero en la placa se ensayó 8 veces.

Las placas se lavaron con 250 µl/pocillo de tampón de alta concentración salina (KNa 0,15 M pH 7,2, NaCl 2 M, MgSO₄ 0,058 M, Tween 20 al 0,05%) en un lavador de placa automatico (Tecan, PowerWasher™). Se dispensaron manualmente 10 µl/pocillo de IgG, IgM o IGA antihumana de cabra biotinilada (Jackson, PA, EE.UU.), 1 µg/ml en TBST, y las placas se incubaron durante 30 min a 25°C. La placa se lavó otra vez con tampón de alta concentración salina.

Se añadió manualmente europio conjugado con estreptavidina, Wallac, AD0062 (1 µl/ml, 10 µl/pocillo) seguido de incubación durante 30 min a 25°C en la oscuridad. Se repitió el lavado de las placas con el tampón de alta concentración salina. Se añadió tampón de potenciación Delfia™ (Wallac, 730232, 10 µl/pocillo) a los pocillos y las placas se incubaron al menos 30 min en la oscuridad. Se leyó la fluorescencia de los pocillos con Victor 1420 (Wallac) usando los ajustes de fluorescencia resuelta en el tiempo Émi. 612 nm y Exc. 340 nm.

El valor discriminante se calculó a partir del percentil 80 de la población normal. De acuerdo con esta definición se identificaron una serie de glucanos que tenían algún grado de poder de separación entre los grupos de paciente (véase a continuación). La “separación” basada en un determinado glucano se definió como al menos 50% (12/24) de muestras positivas en los grupos de “angina inestable” o “angina estable”, y 5 o menos muestras positivas en el grupo “sin placa”.

Glucano LinearCode		Angina inestable	Angina estable	Sin placas
Ga4Ga	Positivos	12	2	5
	% Positivos	52	8	21
Gb	Positivos	19	10	5
	% Positivos	83	42	21
ANa	Positivos	13	8	5
	% Positivos	57	33	21
AN b	Positivos	15	8	5
	% Positivos	65	33	21
GNb4GNb	Positivos	13	8	5
	% Positivos	57	33	21
Xa	Positivos	21	7	5
	% Positivos	100	29	21

Los resultados demuestran que se puede usar una combinación de glucanos Glc(α 1-4)Glc(α), Glc(β), GalNAc(α), GalNAc(β), GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β) y Xilosa(α) para distinguir satisfactoriamente entre las poblaciones con angina estable e inestable. Estos resultados demuestran que se puede desarrollar un biomarcador basado en anticuerpos IgA que se unen a glucanos que distinguen entre pacientes con angina inestable y estable.

Ejemplo de referencia 10

Unión de células CD4+ a una pluralidad de glucanos inmovilizados sobre un sustrato sólido

- 5 Se examinó la unión de células CD4+ de 7 individuos sanos a 47 fragmentos de glucanos diferentes inmovilizados en una micromatriz.

Materiales y procedimientos

- 10 Se extrajeron 20 ml de sangre de cada uno de los 7 individuos usando tubos Vacutainer con 10 ml de EDTA. Las muestras de células periféricas se centrifugaron (230 x g, 900 rpm, 10 min a temperatura ambiente). Después se separó el plasma y los 2 ml superiores de la fracción celular se transfirieron a un tubo de 15 ml. Para el enriquecimiento de las células CD4+, se añadieron 100 μ l del reactivo RossetteSep a los tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después las muestras se diluyeron dos veces en PBS/FSC al 2% y se puso una capa de 5 ml de Ficoll bajo la suspensión celular usando una pipeta Pasteur de vidrio.

- Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, 2400 rpm (-700 x g) con desaceleración de la centrifuga. Después de centrifugación, los tubos se sacaron de la centrifuga con cuidado. La capa superior se extrajo suavemente usando una pipeta estéril, dejando la capa de linfocitos sin alterar en la interfase. Usando una pipeta estéril la fracción de leucocitos se transfirió a un tubo limpio, y el tubo se llenó completamente con PBS/FCS al 2%. Las células se lavaron dos veces otra vez por centrifugación durante 10 minutos, 230 x g (1000 rpm) y se volvieron a suspender en PBS/FSC al 2%. Después de las centrifugaciones, las células se vuelven a suspender en 500 ml de RPMI-1640/FCS al 2%.

- 25 Las células se diluyeron en solución de Türk 1:10 y se contaron. Después del recuento las células se diluyeron a una densidad de 5×10^6 células/ml en RPMI-1640/FCS al 2%, y después se pusieron en una placa de 24 pocillos, 1 ml/pocillo. Las suspensiones de células se incuban toda la noche en incubador al 95% de humedad, 37°C, CO₂ al 5%.

- 30 Para determinar los rendimientos de la separación de células por separación FACS, se suspendieron 250.000 células en 1 ml de tampón de FACS y después se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm, 4°C. El líquido sobrenadante se decantó. Las células se volvieron a suspender en 50 μ l de tampón de FACS y se marcaron con 5 μ l de anticuerpo anti-CD4. Las células se incubaron durante 30 minutos sobre hielo, tapadas de la luz. Se añadió 1 ml de tampón de FACS enfriado con hielo y se centrifugaron 10 minutos, 2000 rpm, 4°C. Después las células se volvieron a suspender en 300 μ l de tampón de FACS, se almacenaron sobre hielo y se puntuaron en una máquina FACS.

- Se pusieron GlycoChips en soportes de portaobjetos en recipientes de plásticos con papel húmedo para retener la humedad. La suspensiones de células se pusieron en placas con 1,2 μ l/pocillo en el GlycoChip, después se incubaron en incubador con CO₂ al 5% (95% de humedad, 37°C) durante una hora. Después de la incubación, los portaobjetos se pusieron suavemente con la cara superior hacia abajo en la cámara de centrifugación inmersos en PBS. Las GlycoChips se centrifugaron durante 2 minutos a 700 rpm (fuerza g mínima, ~50 x g). Los portaobjetos se observaron por microscopio y se fijaron en PBS/formaldehído al 3,7% a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Después los portaobjetos se lavaron ligeramente x3 en DDW y se secaron al aire.

- 45 Se preparó una solución de yoduro de propidio en PBS y se puso en placa con 1,2 μ l/pocillo. Se incubaron GlycoChips en condiciones de humedad durante 15 minutos, y después se aclararon delicadamente x3 sumergiéndolas en DDW. Después los portaobjetos se secaron al aire en la oscuridad y se hizo un barrido a los parámetros del yoduro de propidio de Exc. 535 nm, Emi. 655 nm en un escáner de matriz. Se analizó la imagen y se determinaron las densidades de células.

50

Resultados

- Los glucanos y controles usados para los estudios de unión se muestran a continuación en la Fig. 20. Las estructuras están escritas en sintaxis de LinerCode™, véase la Tabla 1 para la traducción.

- En la Fig. 20 se muestra un histograma que muestra el perfil de unión de células CD4+ de un solo individuo a diferentes glucanos. Se muestra la unión en DLU/mm² y se indica para cada uno de los glucanos o controles. En la Fig. 21A se muestra la unión de células CD4+ a glucanos o controles de los siete individuos. La Fig. 21A muestra la fluorescencia relativa mediana para las células CD4+ de cada uno de los siete individuos.

- Estos resultados demuestran que la unión de las células CD4+ varía entre los diferentes glucanos. La unión más fuerte se observó en los siguientes glucanos, en orden de su afinidad relativa: las células CD4+ se unen a los siguientes glucanos, presentados en LinerCode; NNa3Ab4(Fa3)GNb > Mb4Gb > GNb4GNb > Ma3Ma > Ab6Ab. También se detectó la unión de células CD4+ a glucanos con restos de manosa terminales o con restos Sialyl Lewis X. También se detectó la variación de unión de CD4+ a glucanos particulares entre los diferentes individuos.

65

Otras realizaciones

Hay que entender que aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el alcance de la invención, la cual se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tablas y Figuras

TABLA 1

Sacáridos presentados en la matriz de glucanos

Glucano	IUPAC	LINEARCODE®	Nombre común
0	pNP-OH	pNP-0	
1	Gal (α)	Aa	
2	Gal (β)	Ab	
3	Gal (β 1-3) GalNAc (α)	Ab3ANa	
4	Gal (β 1-3) GlcNAc (β)	Ab3GNb	
5	Gal (β 1-4) Glc (β)	Ab4Gb	Lactosa
6	Gal (β 1-6) Gal (β)	Ab6Ab	
7	GalNAc (α)	ANa	
8	GalNAc (β)	ANb	
9	Fuc (α)	Fa	
10	Fuc (β)	Fb	
11	Glc (α)	Ga	
12	Glc (α 1-4) Glc (α)	Ga4Ga	Maltosa
13	Glc (α 1-4) Glc (β)	Ga4Gb	
14	Glc (β)	Gb	
15	Glc (β 1-4) Glc (β)	Gb4Gb	Celobiosa
16	Glc (β 1-4) Glc (β 1-4) Glc (β)	Gb4Gb4Gb	Celotriosa
17	Glc (β 1-4) Glc (β 1-4) Glc (β 1-4) Glc	Gb4Gb4GbGb4Gb	Celopentanosa
18	Glicerol	Glycerol	
19	GlcNAc (α)	GNa	

ES 2 297 248 T3

20	GlcNAc (β)	GNb	
21	GlcNAc (β 1-3) GalNAc (α)	GNb3ANa	
22	GlcNAc (β 1-4) GlcNAc (β)	GNb4GNb	Chitobiosa
23	L-Rha (α)	Ha	
24	GalA (β)	Lb	
25	Man (α)	Ma	
26	Man (β)	Mb	
27	Neu5Ac (α)	NNa	
28	L-Araf (α)	Ra	
29	GlcA (β)	Ub	
30	X(α)	Xa	
31	X(β)	Xb	
32	Gal (β1-3) [GlcNAc (β1-6)] GalNAc (α)	Ab3(GNb6)ANa	
33	Gal (β1-4) GlcNAc (α)	Ab4GNa	
34	Gal (α1-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β)	Aa3Ab4GNb	Trisacárido lineal B-2
35	Gal (β1-3) Gal (β1-4)GalNAc (β)	Ab4GNb	N-Acetilo
36	Man (β1-4) GlcNAc (β)	Mb4Gb	
37	GlcNAc (β1-6)GalNAc (α)	GNb6ANa	
38	Fuc (α 1-2) Gal (β)	Fa2Ab	
39	Neu5Ac (α2-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-	NNa3Ab4(Fa3)GNb	Sialyl Lewis X
40	Man (α 1-3) Man (α)	Ma3Ma	
41	GlcNAc (β) 6-sulfato	GN[6S]b	
42	Glc (β 1-3) Glc (β)	Gb3Gb	
43	Gal(β) 3-sulfato	A[3S]b	
44	Neu5Ac (α1-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β)	NNa3Ab4GNb	Sialil-lactosamina
45	Man (α 1-3) [Man (α1-6)] Man (β)	Ma3(Ma6)Mb	
46	Neu5Ac (α1-3) Gal (β 1-4) Glc (β)	NNa3Ab4Gb	Sialil-lactosa
47	GlcNAc (β 1-3) Gal (α1-4) Glc (β)	GNb3Ab4Gb	Lacto-3
48	Gal (α1-4) Gal (β 1-4) Glc (β)	Aa4Ab4Gb	antígeno Pk
49	Neu5Ac (α1-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β)	NNa6Ab4GNb	
50	Gal (α 1-4) [Fucp (α 1-3)] GlcNAc (b)	Ab4(Fa3)GNb	Lewis X

ES 2 297 248 T3

51	Neu5Ac (α 1-3) Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3)]	NNa3Ab3(Fa4)GNb	Sialyl Lewis A
52	Man (α 1-6) Man α	Ma6Ma NNa3Ab3GNb	Sialyl Lewis c
53	Neu5Ac (α 1-3) Gal (β 1-3) GlcNAc (β)		
54	Neu5Ac (α 1-3) Gal (β 1-3) GalNAc (α)	NNa3Ab3ANa	antígeno SiT

TABLA 2

Número de muestras positivas que tienen señales de unión por encima del percentil 97% de población sana

Glucano	Resultado	EM	Sano
Glc(α)	Positivo	19/42 (45%)	2/44 (4,5%)
	Negativo	23/42 (55%)	42/44 (96%)
Glc(α 1-4) Glc(α)	Positivo	20/42 (48%)	2/44 (4,5%)
	Negativo	22/42 (52%)	42/44 (96%)
Glc(α 1-4) Glc(α) o Glc(α)	Positivo	25/42 (60%)	3/44 (6,8%)
	Negativo	17/42 (40%)	41/44 (93%)

TABLA 3

Número de muestras positivas que tienen señales de unión por encima del percentil 80% de población con EM "estable"

Glucano	Resultado	Ataque	Estable	Sano
Glc(α)	Positivo	15/18 (83%)	5/24 (21%)	2/44 (4,5%)
	Negativo	3/18 (17%)	19/24 (79%)	42/44 (96%)
Glc(α 1-4) Glc(α)	Positivo	13/18 (72%)	5/24 (21%)	2/44 (4,5%)
	Negativo	5/18 (28%)	19/24 (79%)	42/44 (96%)
Glc(α 1-4) Glc(α) o Glc(α)	Positivo	16/18 (89%)	7/24 (29%)	2/44 (4,5%)
	Negativo	2/18 (11%)	17/24 (71%)	42/44 (96%)

TABLA 4

Nº	LinearCode™
1	A[3S]b
2	Aa
3	Aa3Ab4GNb
4	Aa4Ab4Gb
5	Ab
6	Ab3(GNb6)ANa
7	Ab3ANa

ES 2 297 248 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

8	Ab3GNb
9	Ab4(Fa3)GNb
10	Ab4Gb
11	Ab4GNb
12	Ab6Ab
13	ANa
14	ANb
15	Fa
16	Fa2Ab
17	Fb
18	Ga
19	Ga4Ga
20	Ga4Ga
21	Gb
22	Gb3Gb
23	Gb4Gb4Gb
24	GN[6S]b
25	GNa
26	GNb
27	GNb3Ab4Gb
28	GNb3ANa
29	GNb4GNb
30	GNb6ANa
31	Ha
32	Lb
33	Ma
34	Ma3(Ma6)Mb
35	Ma3Ma
36	Ma6Ma
37	Mb
38	Mb4Gb
39	NNa3Ab3(Fa4)GNb
40	NNa3Ab3ANa
41	NNa3Ab3GNb
42	NNa3Ab4Gb
43	NNa3Ab4GNb
44	NNa6Ab4GNb
45	0H

ES 2 297 248 T3

46	Ra
47	NNa3Ab4(Fa3)GNb
48	Ub
49	Xa
50	Xb

TABLA 5

Tabla 5. Sacáridos presentados en la matriz de glucanos y nivel de antiglucano				
Glucano N°	Glucano	LinearCode®¹¹	Unión de Ab (URF) *	Ab Relativo
0	pAP	-	NA	NA
1	Gal (α)	Aa	181.069	10
2	Gal (β)	Ab	119.034	14
3	Gal (β 1-3) GalNAc (α)	Ab3Ana	52.853	
4	Gal (β 1-3) GlcNAc (β)	Ab3GNb	58.239	
5	Gal (β 1-4) Glc (β)	Ab4Gb	92.170	
6	Gal (β 1-6) Gal (β)	Ab6Ab	151.313	11
7	GalNAc (α)	ANa	64.429	
8	GalNAc (β)	ANb	57.832	
10	Fuc (α)	Fa	47.727	
11	Fuc (β)	Fb	63.782	
12	Glc (α)	Ga	109.091	
13	Glc (α 1-4) Glc (α)	Ga4Ga	80.024	
14	Glc (α 1-4) Glc (β)	Ga4Gb	127.594	13
15	Glc (β)	Gb	112.513	
16	Glc (β 1-4) Glc (β)	Gb4Gb	239.830	9
17	Glc (β 1-4) Glc (β 1-4)	Gb4Gb4	284.361	7
18	Glc (β 1-4) Glc (β 1-4)	Gb4Gb4	311.235	5
19	Glycerol	Glicerol	52.884	
20	GlcNAc (α)	GNa	1.031.130	1
21	GlcNAc (β)	GNb	311.341	
22	GlcNAc (β 1-3) GaNAc	GNb3A	294.624	6
23	GlcNAc (β 1-4) GlcNAc	GNb4G	433.604	3
24	L-Rha (α)	Ha	662.337	2
25	GalA (β)	Lb	96.801	
26	Man (α)	Ma	83.647	
27	Man (β)	Mb	77.533	
28	Neu5Ac (α)	NNa	52.028	

ES 2 297 248 T3

29	L-Araf (α)	Ra	51.230	
30	GlcA (β)	Ub	56.719	
31	X(α)	Xa	55.806	
32	X(α)	Xb	78.776	
33	Gal (β 1-3) [GlcNAc	Ab3(GN	84.080	
34	Gal (β 1-4) GlcNAc (α)	Ab4GNa	143.036	12
36	Gal (β 1-3) Gal (β 1-	Aa3Ab4	268.549	8

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar la esclerosis múltiple en un sujeto, el procedimiento comprendiendo:

detectar un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) en una muestra de ensayo obtenida de un sujeto; y

comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con una muestra de control;

en el que dicha muestra de control se selecciona de uno o más individuos que tienen síntomas de esclerosis múltiple y tienen un estado de esclerosis múltiple conocido y uno o más individuos que no muestran síntomas de esclerosis múltiple; diagnosticando de esta forma la esclerosis múltiple a dicho sujeto.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además detectar al menos otro anticuerpo más, cuyo al menos dicho otro anticuerpo más se selecciona de un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-Glc(β), un anticuerpo anti-Gal(β); un anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-L-Araf(α), un anticuerpo anti-L-Rha(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-4)GlcNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-GlcA(β), un anticuerpo anti-GlcA(β) y un anticuerpo anti-Xyl(α), y

comparar los niveles de dicho al menos otro anticuerpo más en dicha muestra de ensayo con los niveles del al menos otro anticuerpo más en dicha muestra de control.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento comprende detectar al menos tres de dichos otros anticuerpos.

4. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento comprende detectar al menos cinco de dichos otros anticuerpos.

5. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho al menos otro anticuerpo más es un anticuerpo anti-Glc(α).

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de control consiste en una población de uno o más individuos que no muestran síntomas de esclerosis múltiple.

7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de control consiste en una población de uno o más individuos que tienen síntomas de esclerosis múltiple con un estado conocido de la esclerosis múltiple.

8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de ensayo es un fluido biológico.

9. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho fluido biológico es sangre entera, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina o saliva.

10. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho fluido biológico es suero.

11. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es una mujer.

12. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un hombre.

13. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) es un anticuerpo de tipo IgM.

14. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) es un anticuerpo de tipo IgA.

15. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) es un anticuerpo de tipo IgG.

16. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti-Glc(α) es un anticuerpo de tipo IgM.

17. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α) es un anticuerpo de tipo IgM.

18. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho diagnóstico es un diagnóstico precoz de la esclerosis múltiple.

19. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de control se determina usando una evaluación por la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad (EDSS) o una evaluación por Imagen por Resonancia Magnética (IRM).

20. Un kit para diagnosticar síntomas asociados con la esclerosis múltiple, el kit comprendiendo:

un primer reactivo que detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(α);

un segundo reactivo que detecta específicamente un segundo anticuerpo seleccionado de un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-Glc(β), un anticuerpo anti-Gal(β), un anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-L-Araf(α), un anticuerpo anti-L-Rha(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-4)GlcNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-GlcA(β), un anticuerpo anti-GlcA(β) y un anticuerpo anti-Xyl(α), y

indicaciones para usar dicho kit.

21. Un kit según la reivindicación 20, que además comprende un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo de tipo IgM.

22. Un sustrato que comprende un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo específico para Glc(α 1-4)Glc(α).

23. Un sustrato según la reivindicación 22, que además comprende otro reactivo que detecta un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Glc(α 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-Glc(β), un anticuerpo anti-Gal(β); un anticuerpo anti-Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc(β), un anticuerpo anti-GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-L-Araf(α), un anticuerpo anti-L-Rha(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-4)GlcNAc(α), anticuerpo anti-Glc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GalNAc(α), un anticuerpo anti-Gal(β 1-3)GlcNAc(β), un anticuerpo anti-GlcA(β), o un anticuerpo anti-GlcA(β) y un anticuerpo anti-Xyl(α).

24. Un sustrato según la reivindicación 23, que además comprende un reactivo que detecta un anticuerpo anti-Glc(α) y un reactivo que detecta un anticuerpo anti-L-Rha(α).

25. El sustrato de la reivindicación 22, en el que dicho sustrato es plano.

26. Un sustrato según la reivindicación 22, en el que dicho sustrato se proporciona como un pocillo de una placa de microvaloración.

27. El sustrato de la reivindicación 22, en el que dicho reactivo es un monosacárido u oligosacárido.

Figura 1

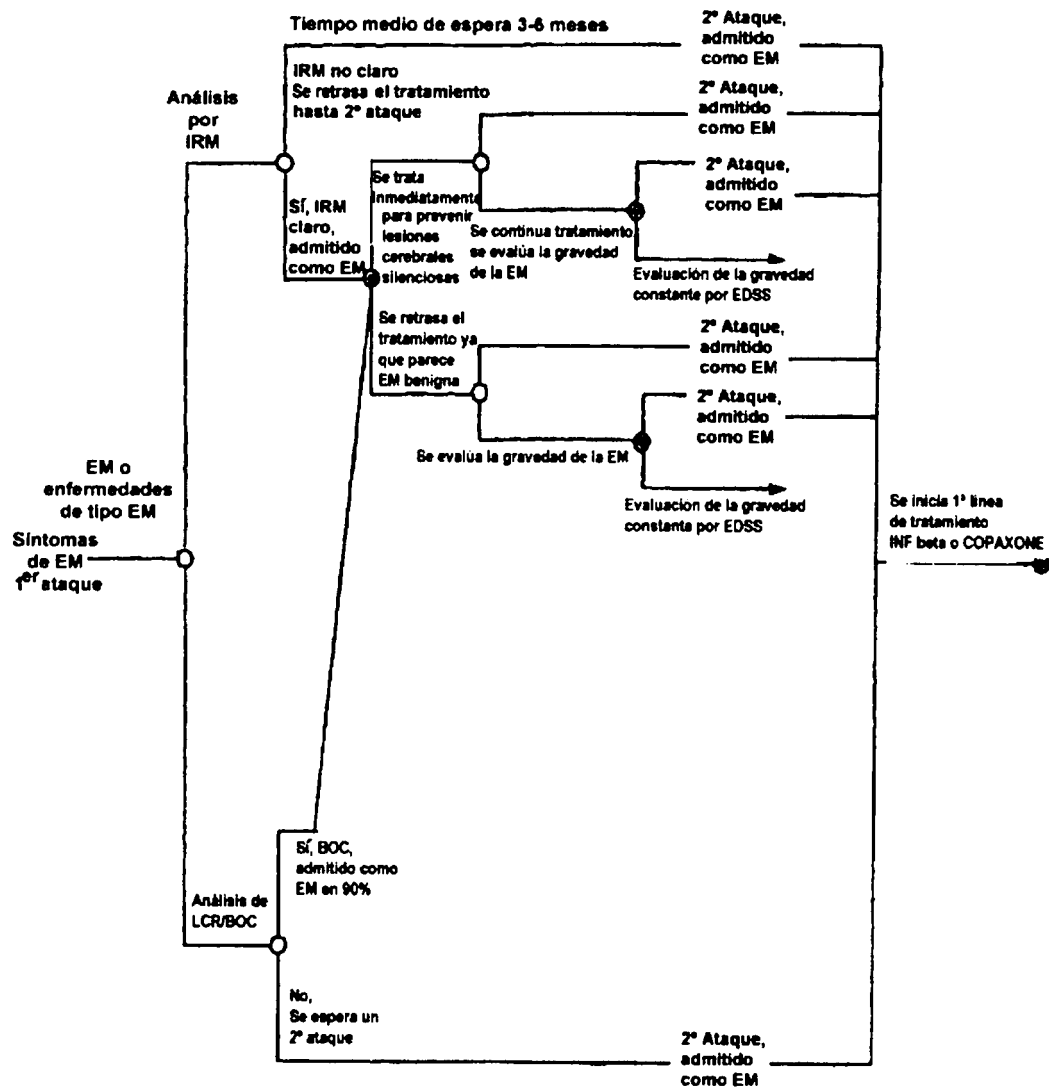


Figura 2

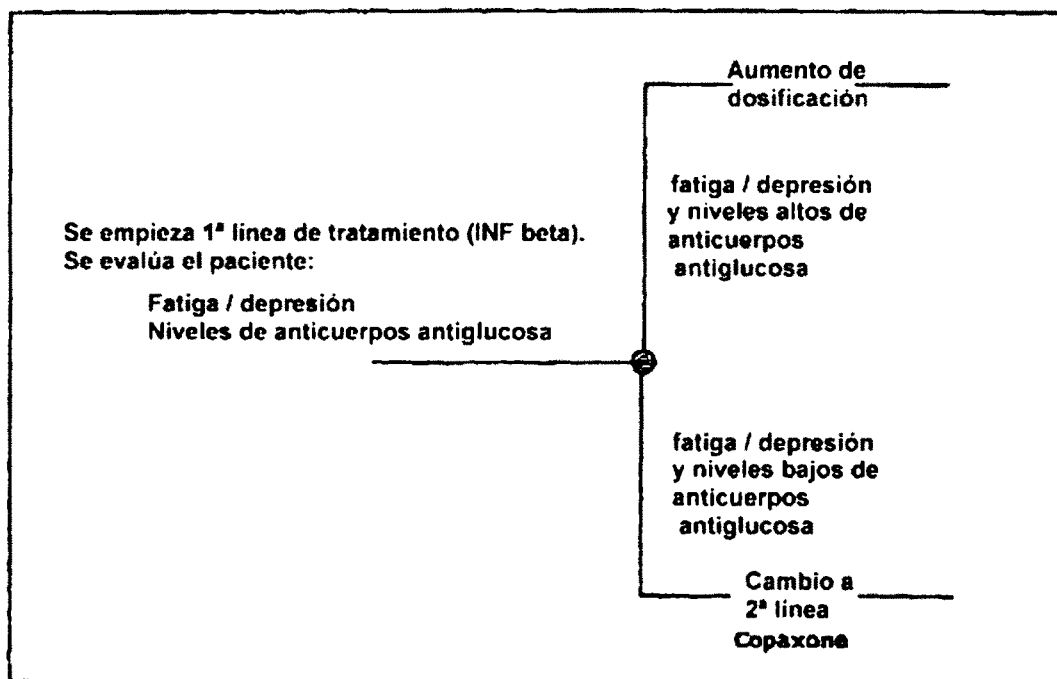
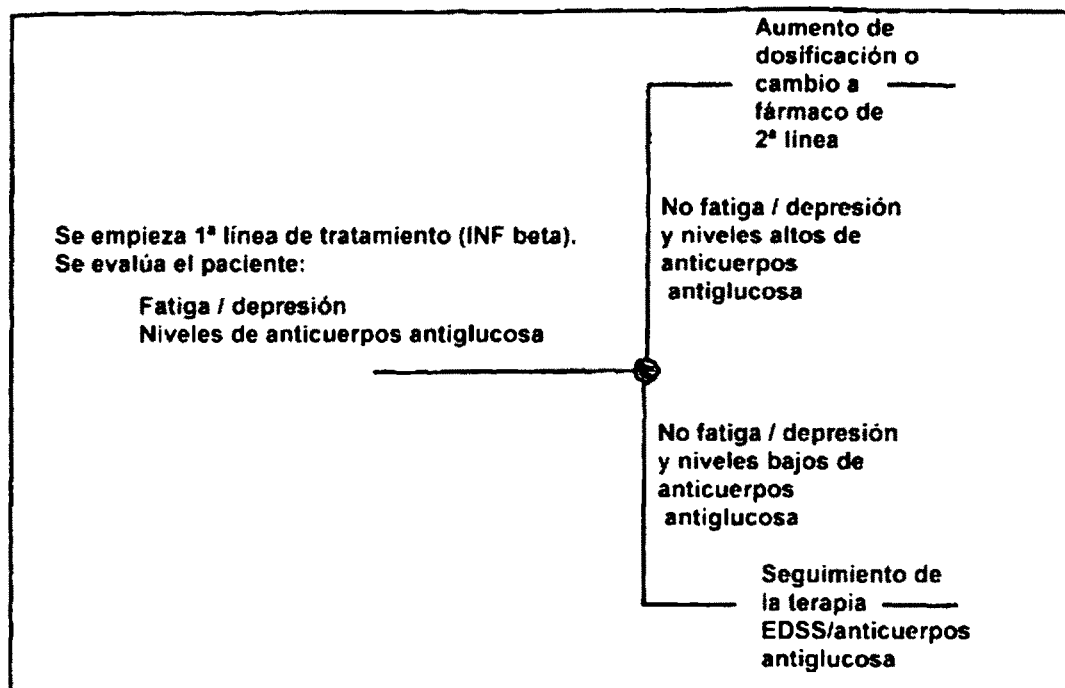
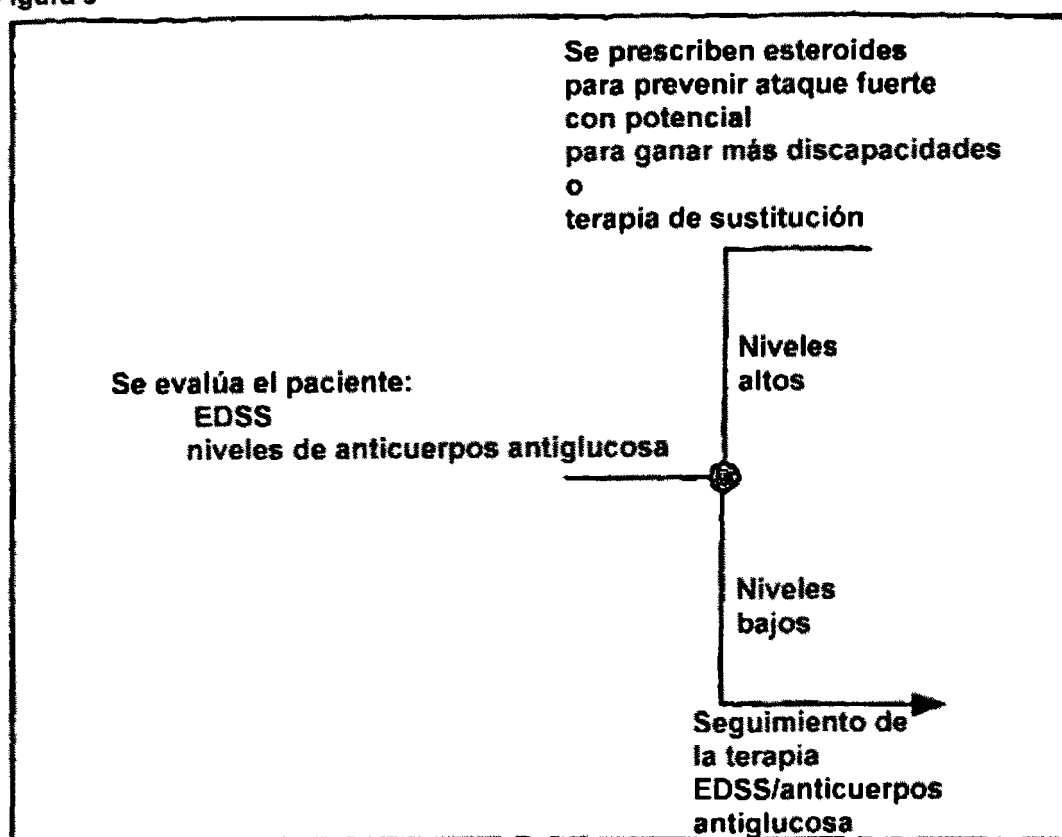


Figura 3



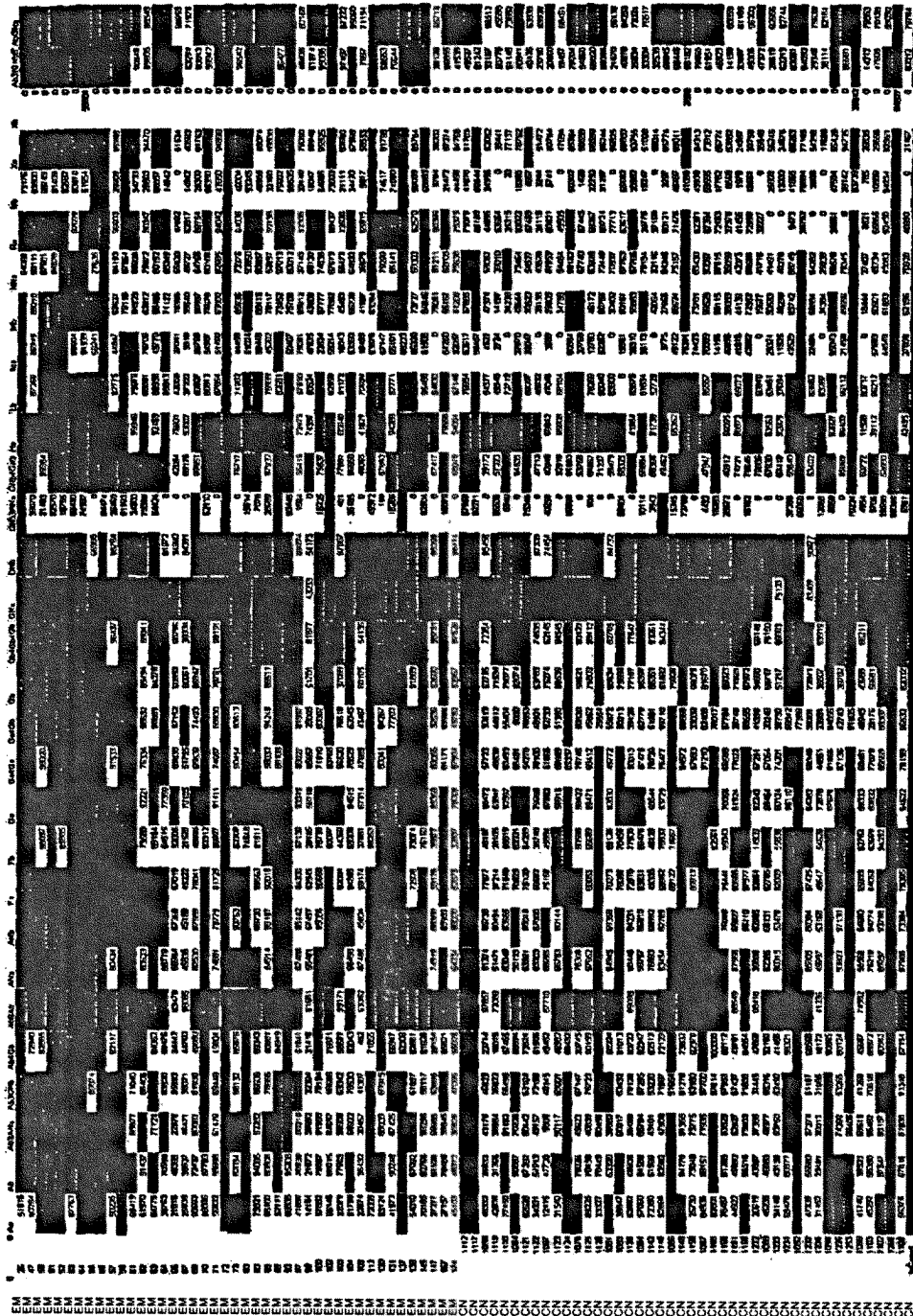


Figura 4

Figura 5

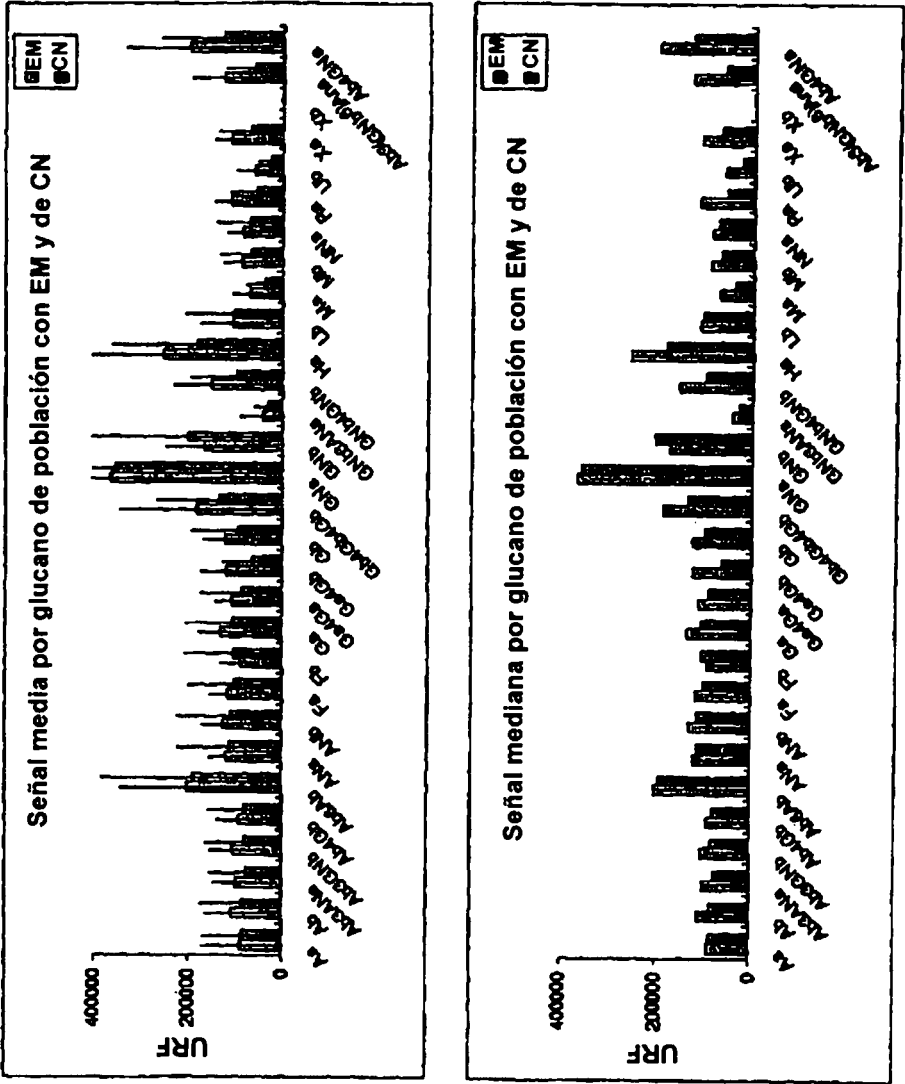


Figura 6

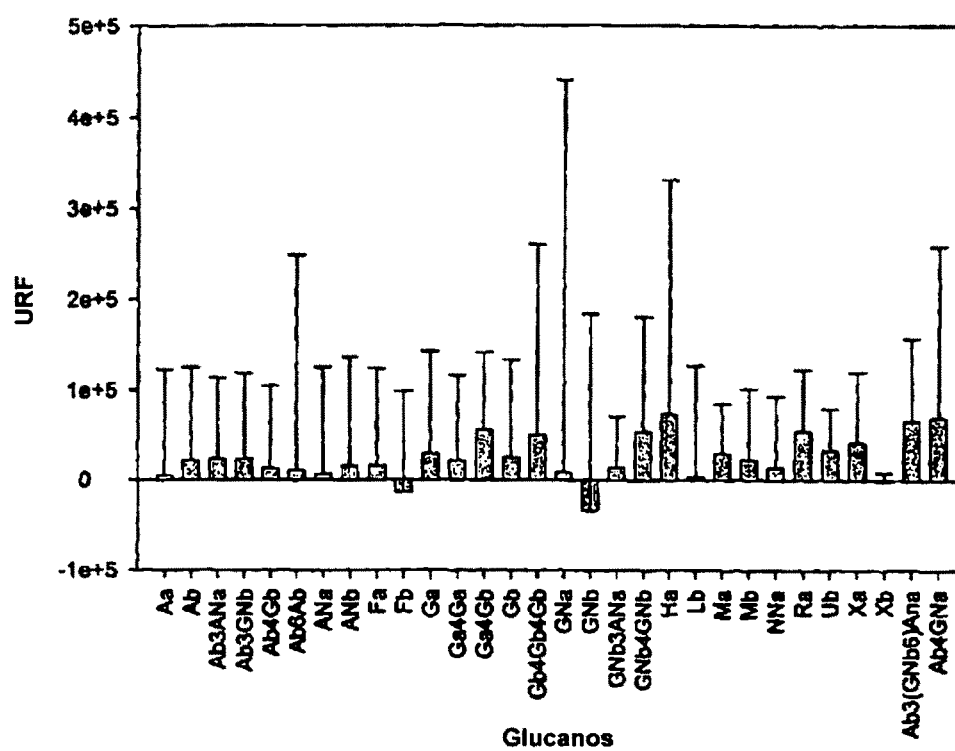


Figura 7

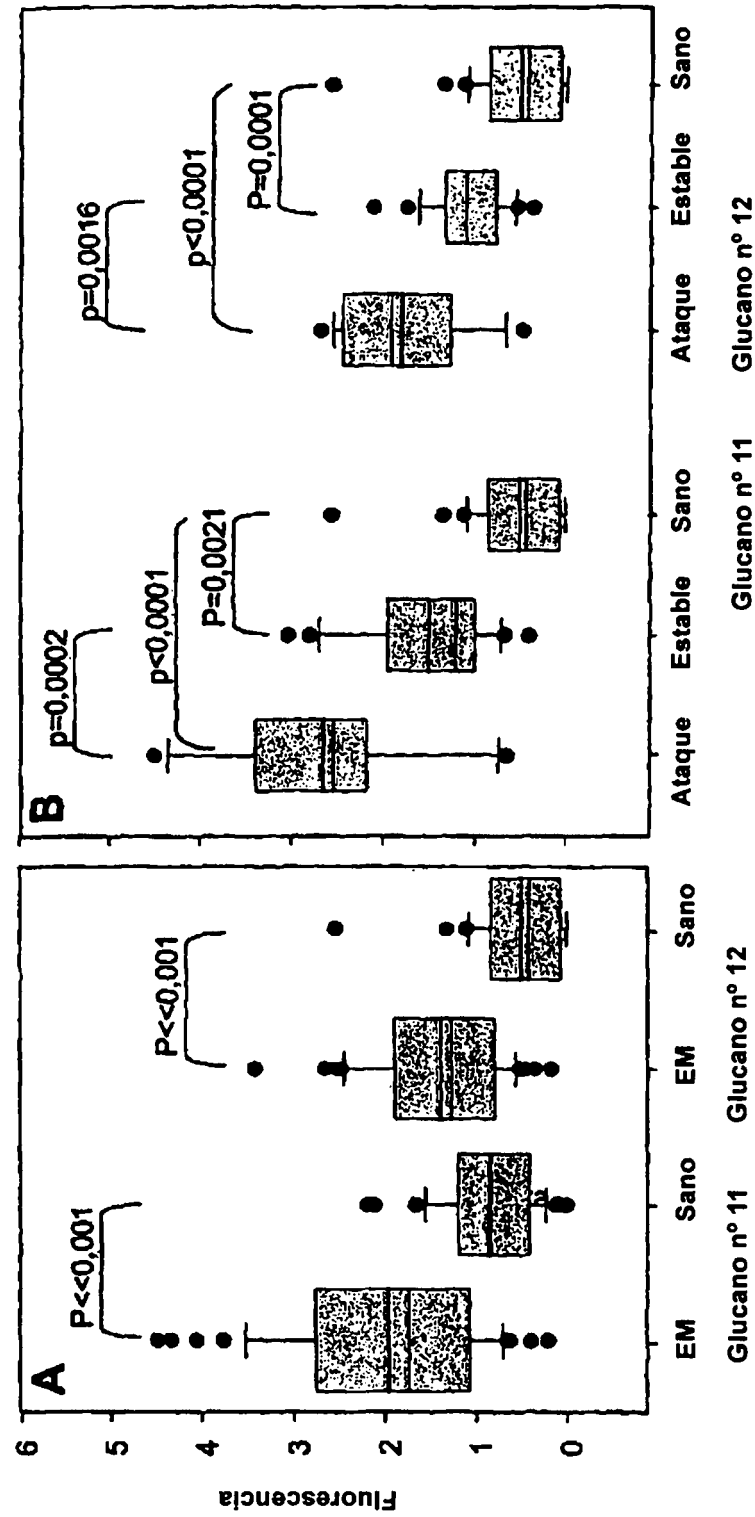
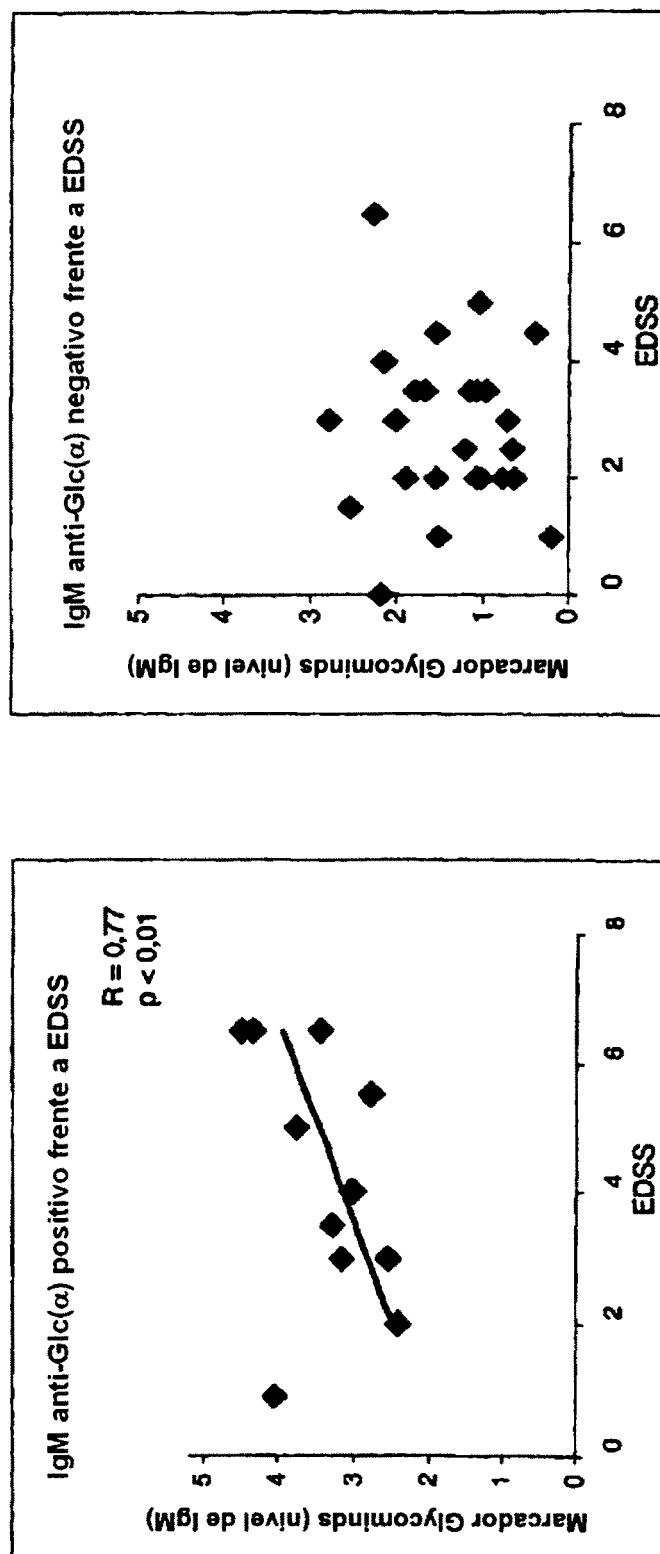


Figura 8



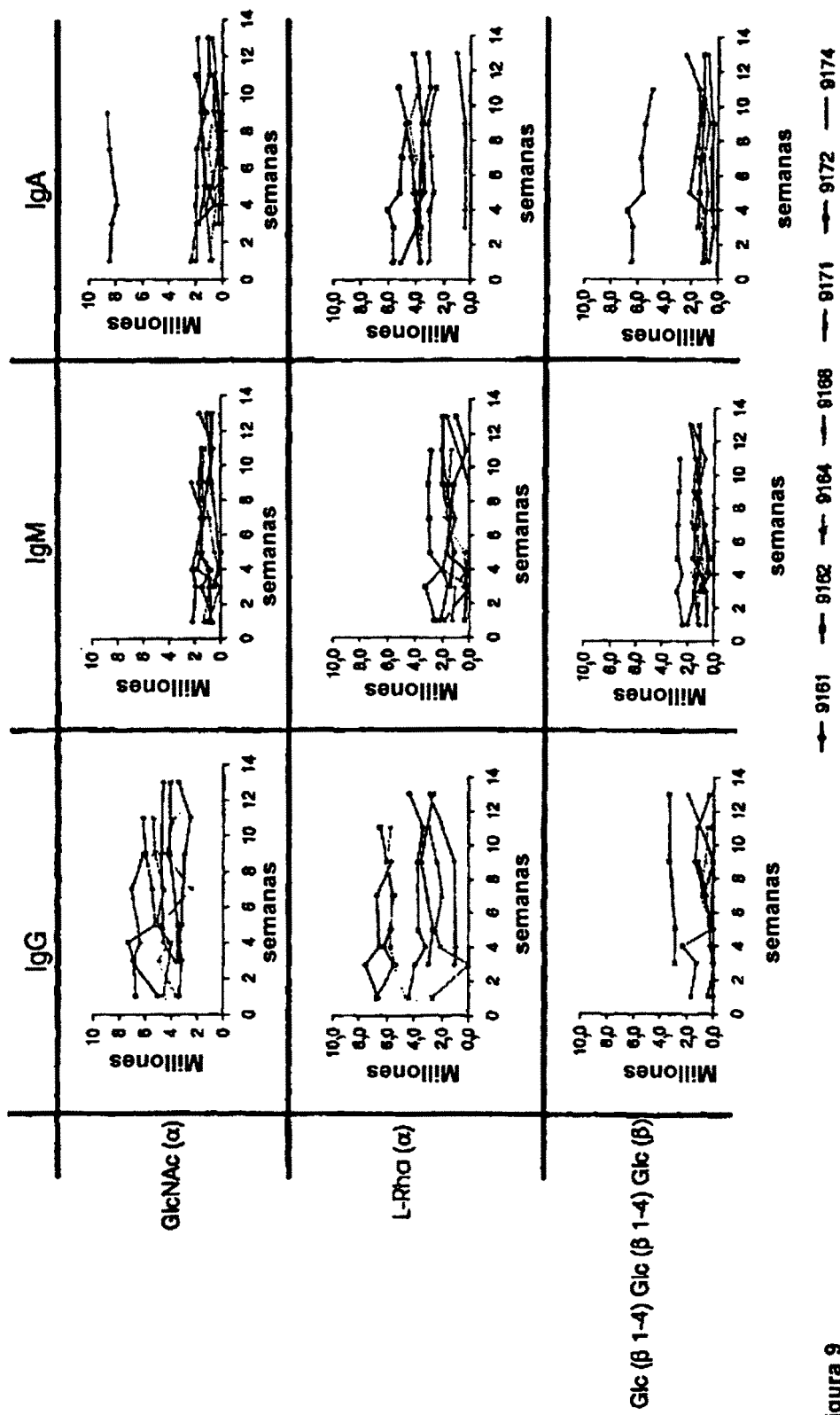


Figura 9

Figura 10

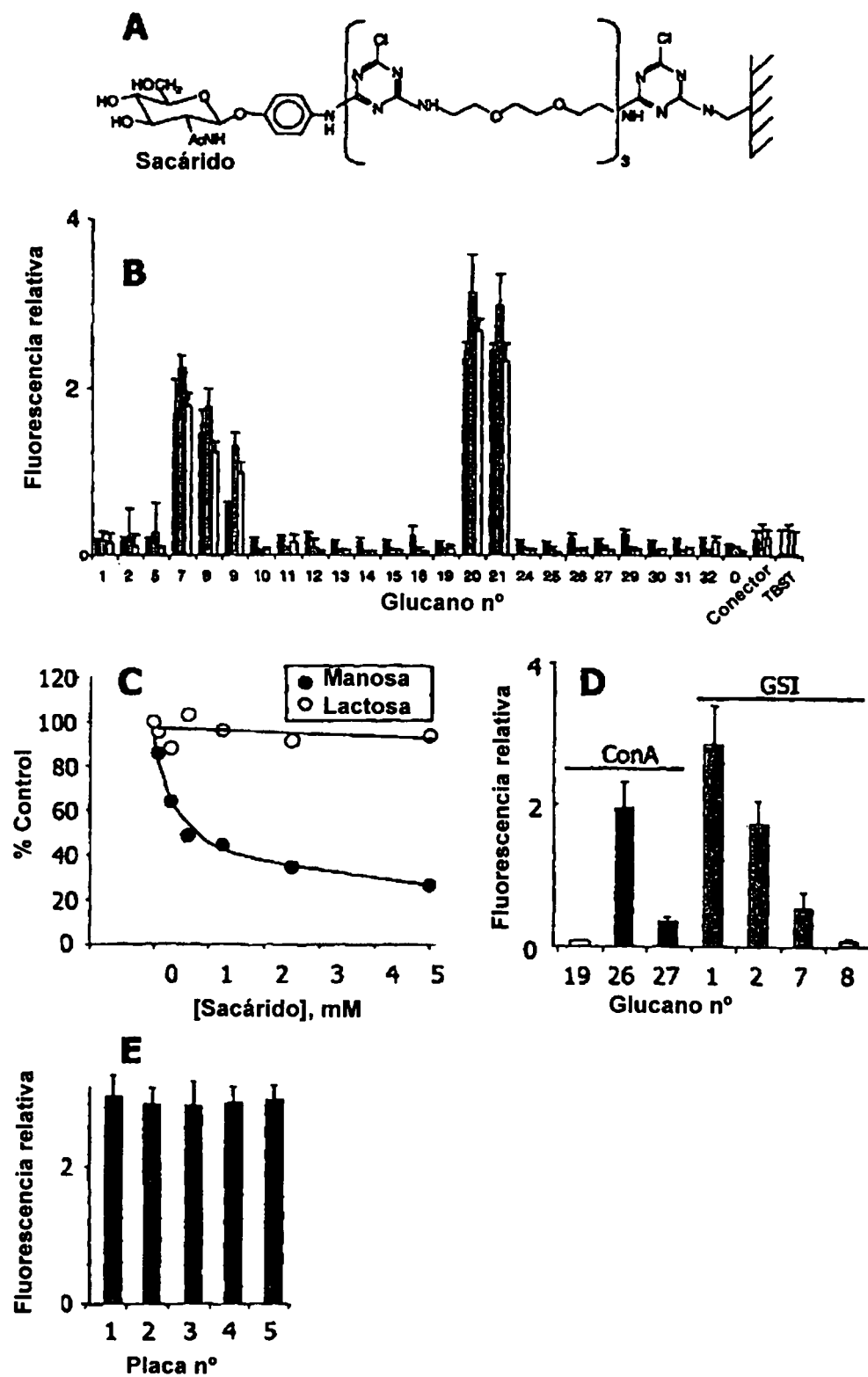


Figura 11

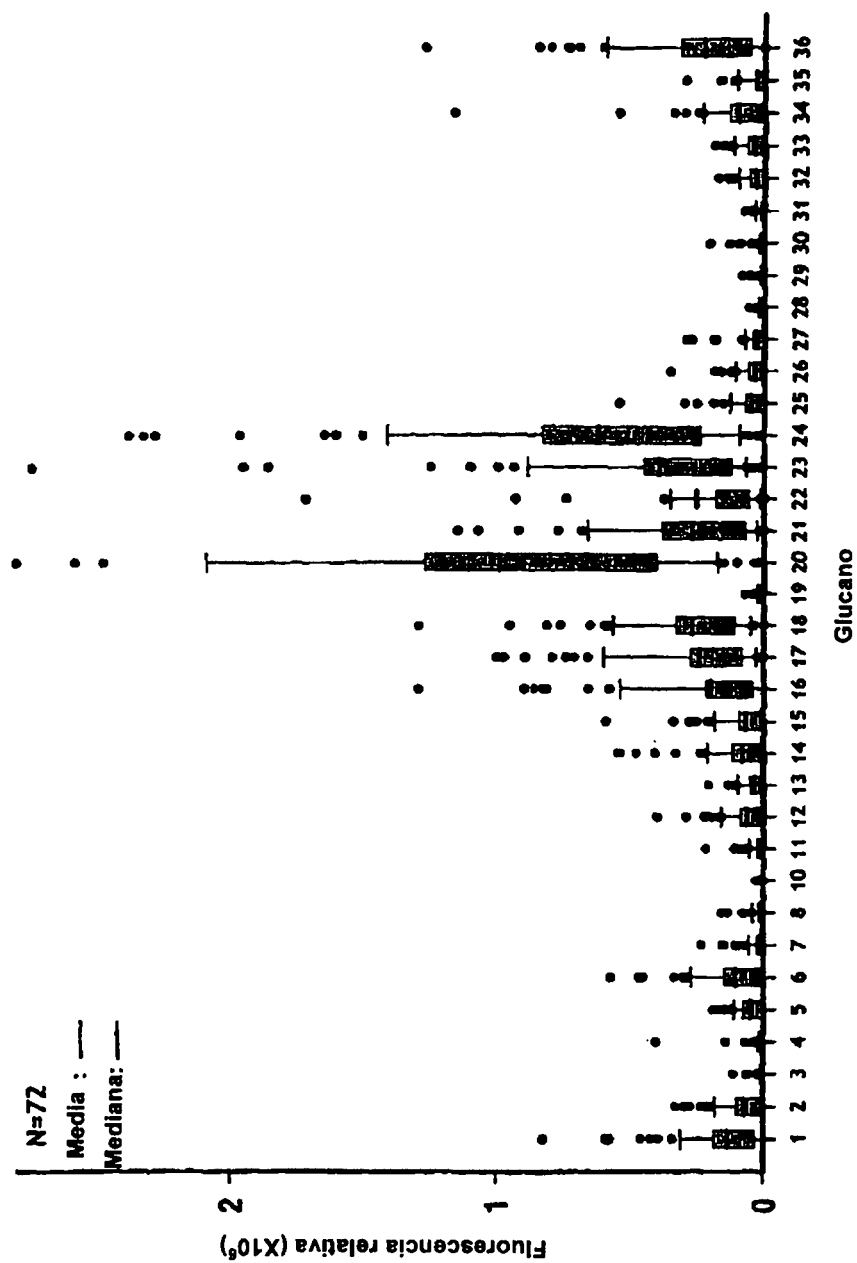


Figura 12

Glucanos →

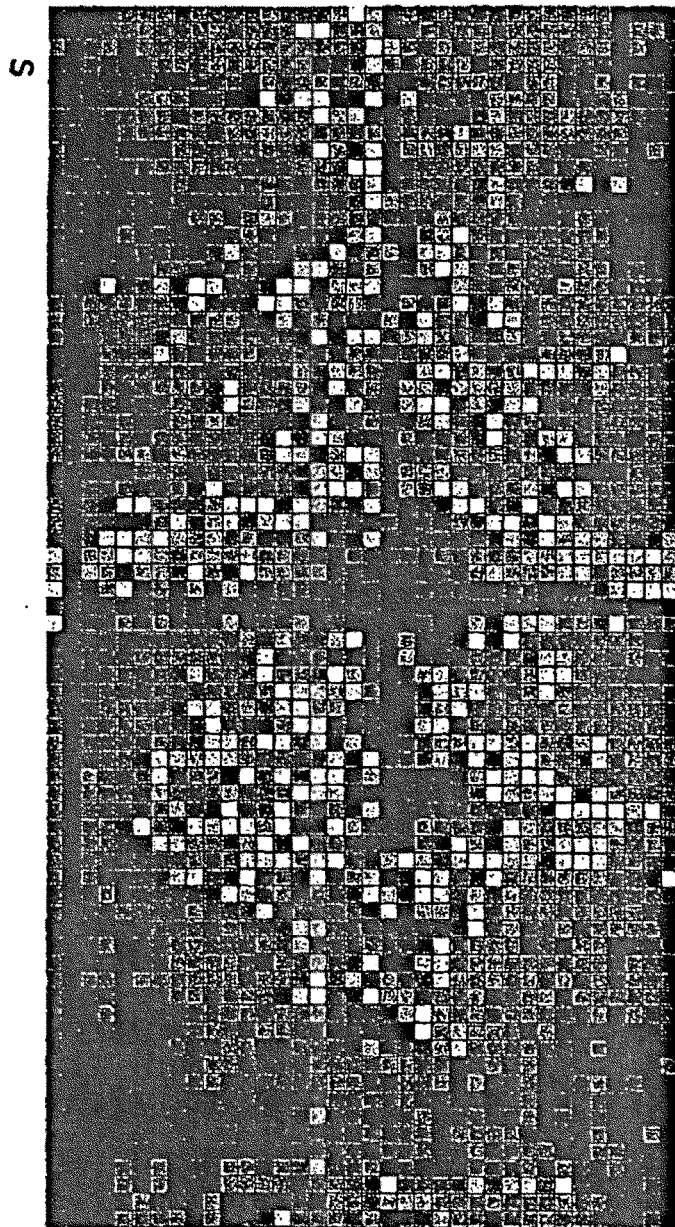


Figura 13

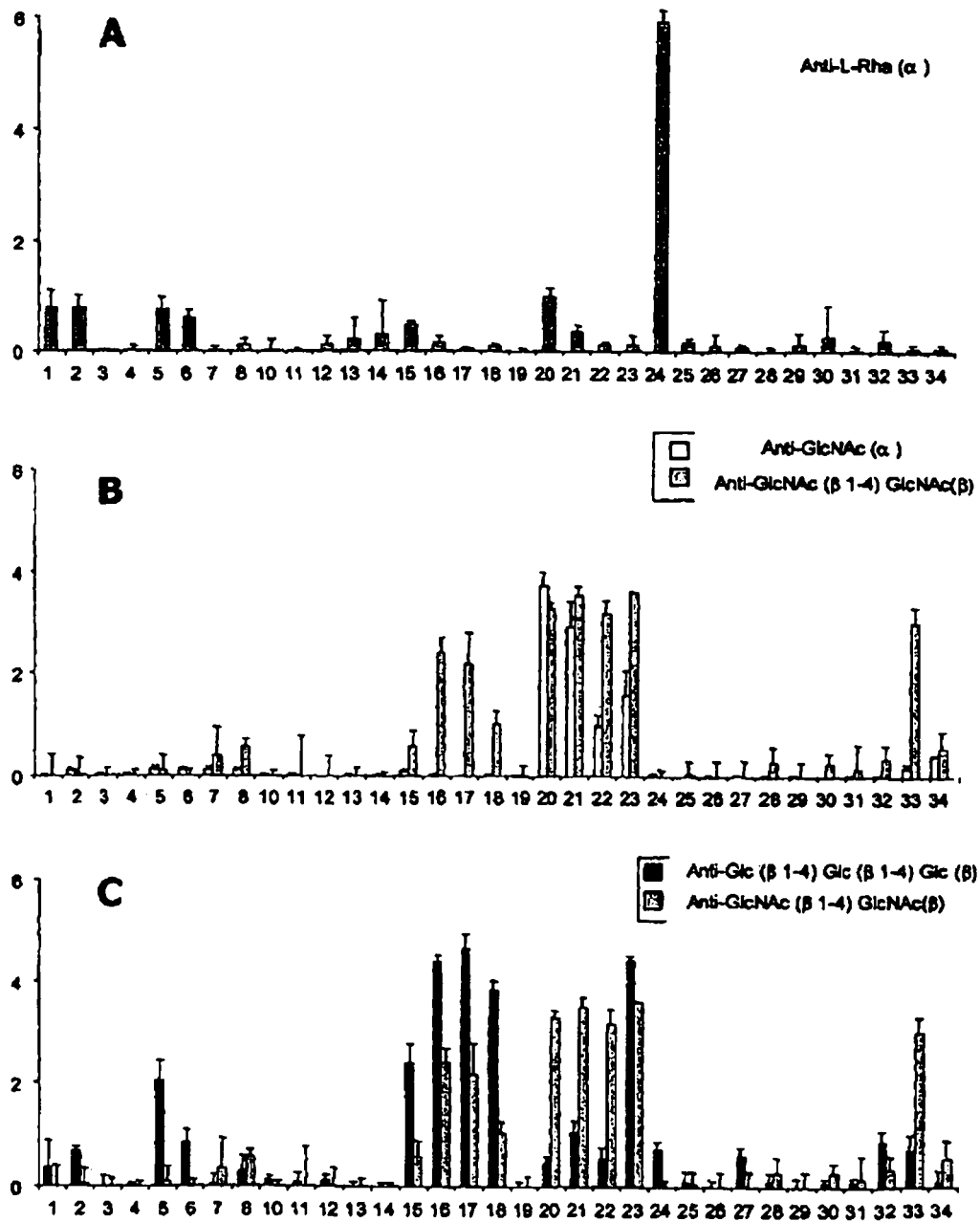


FIG. 14A

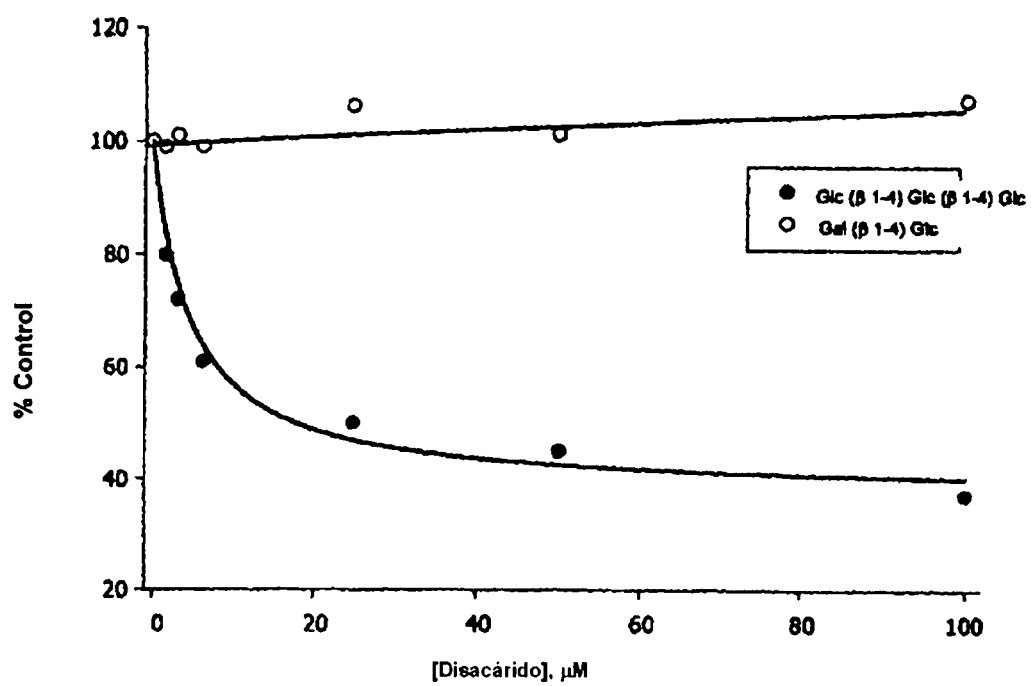
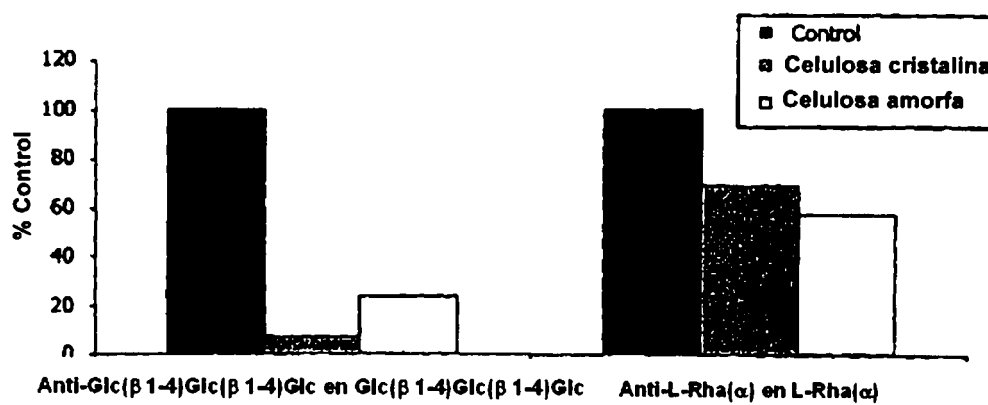


FIG. 14B



FIGS. 15A-15C

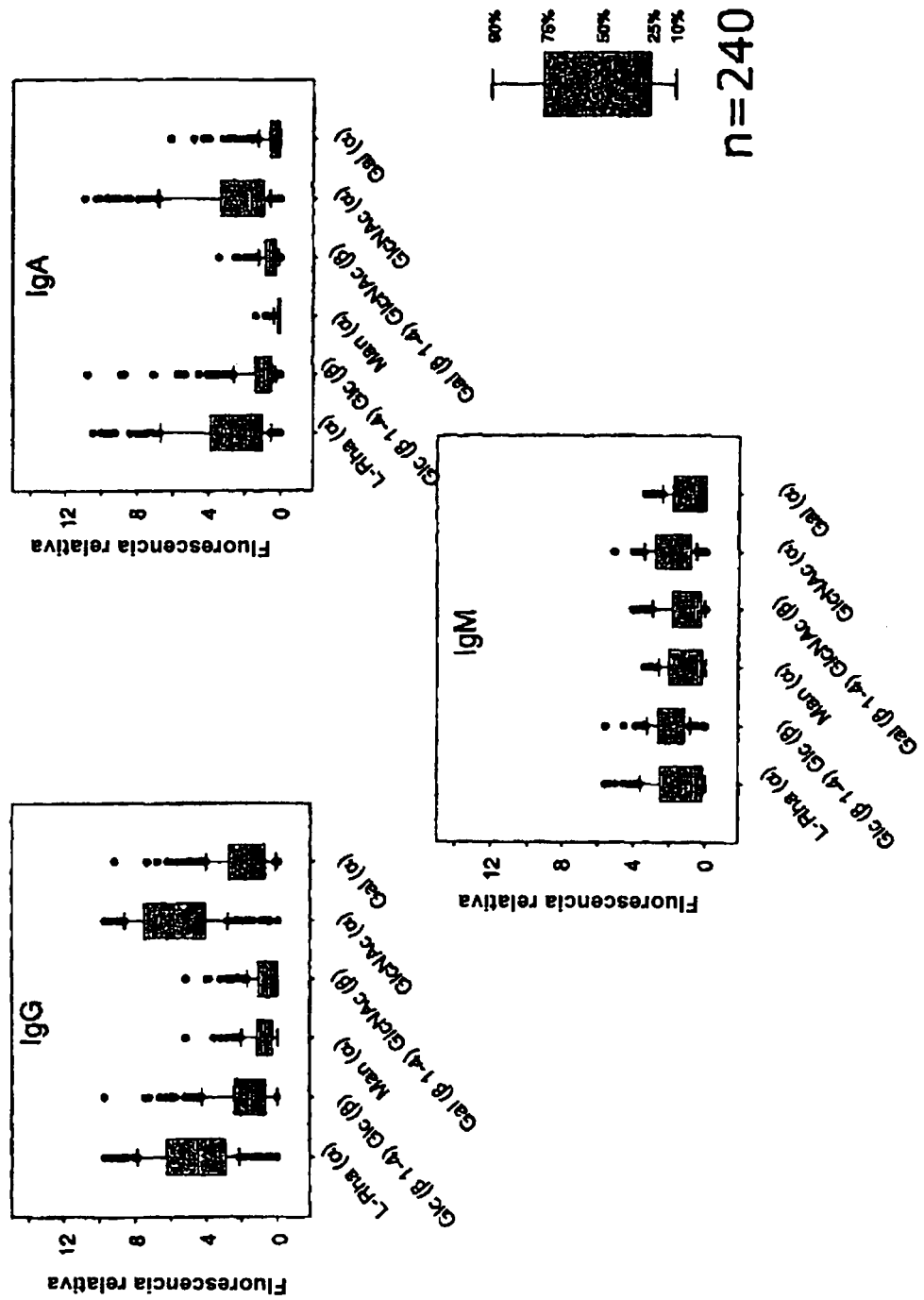


FIG. 16A

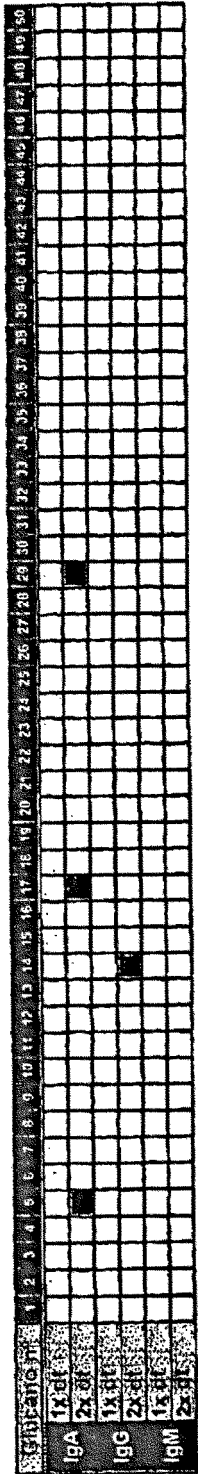


FIG. 16B

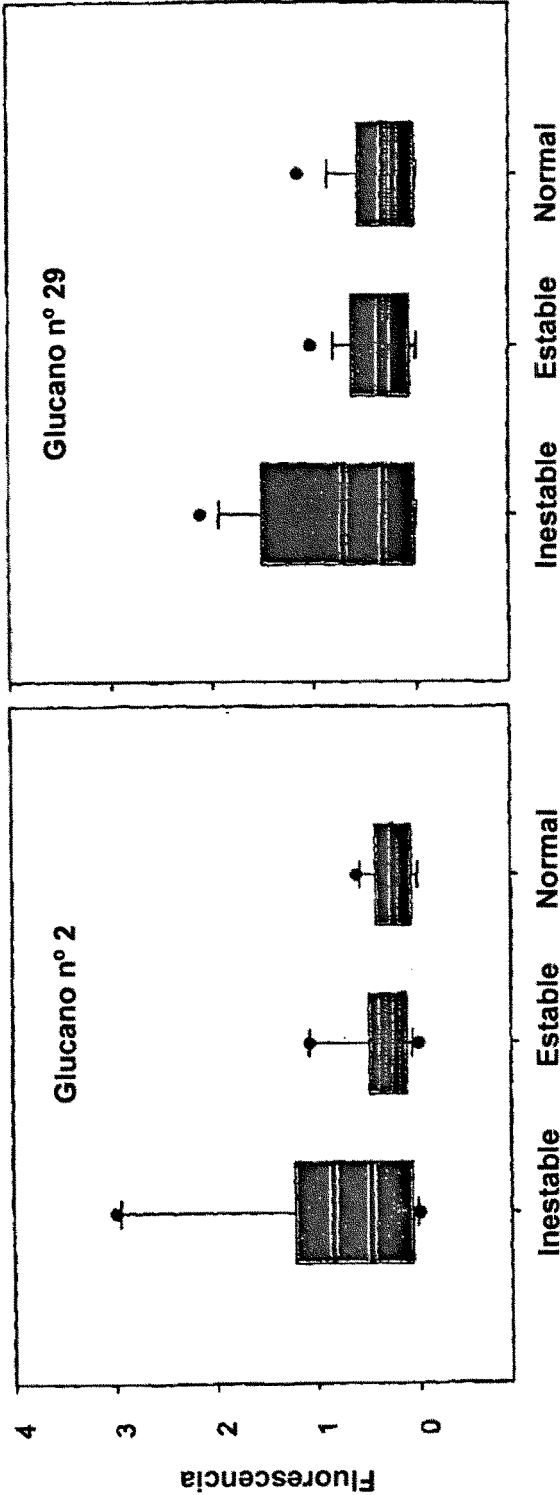


FIG. 17

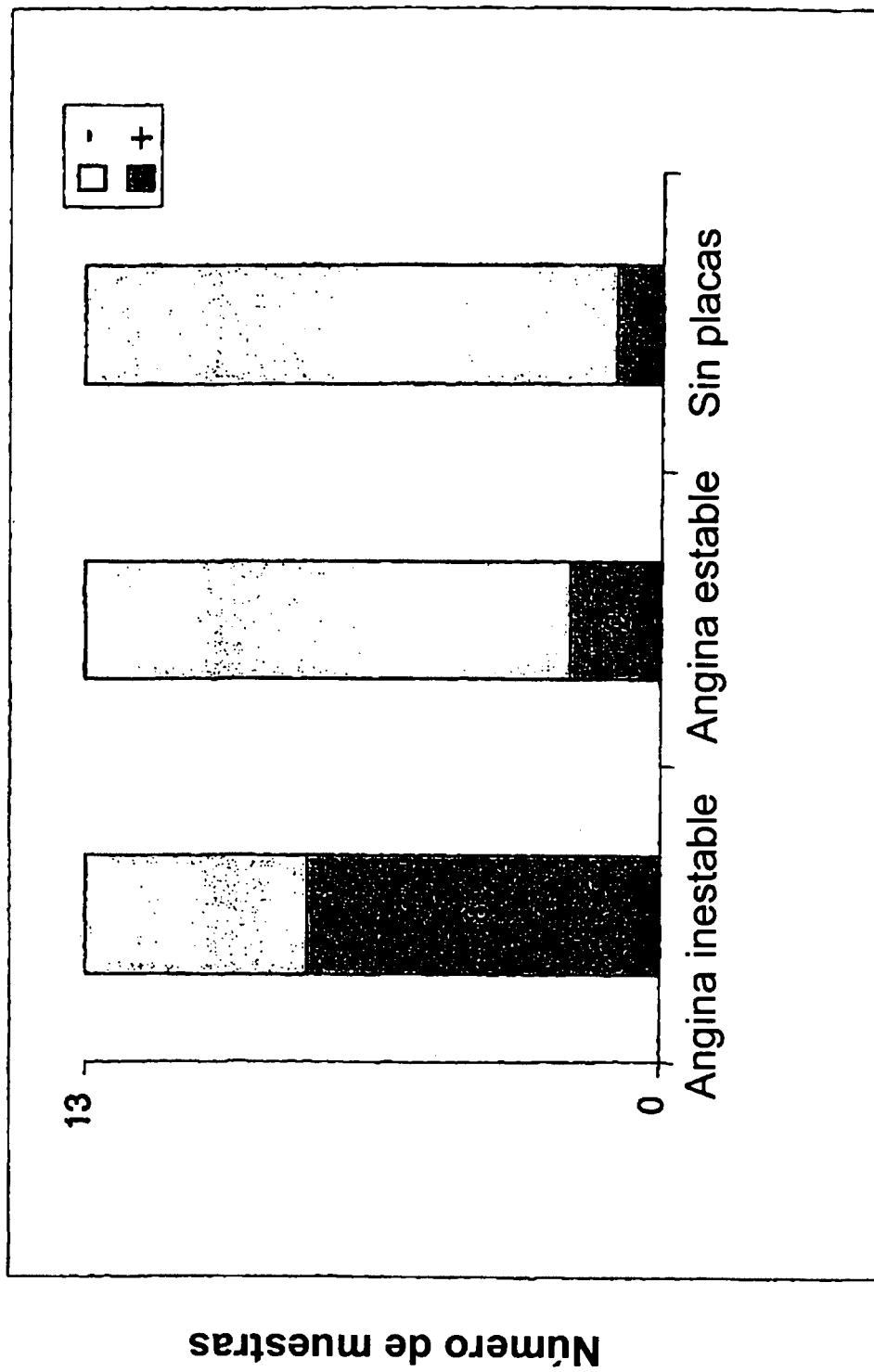


FIG. 18A

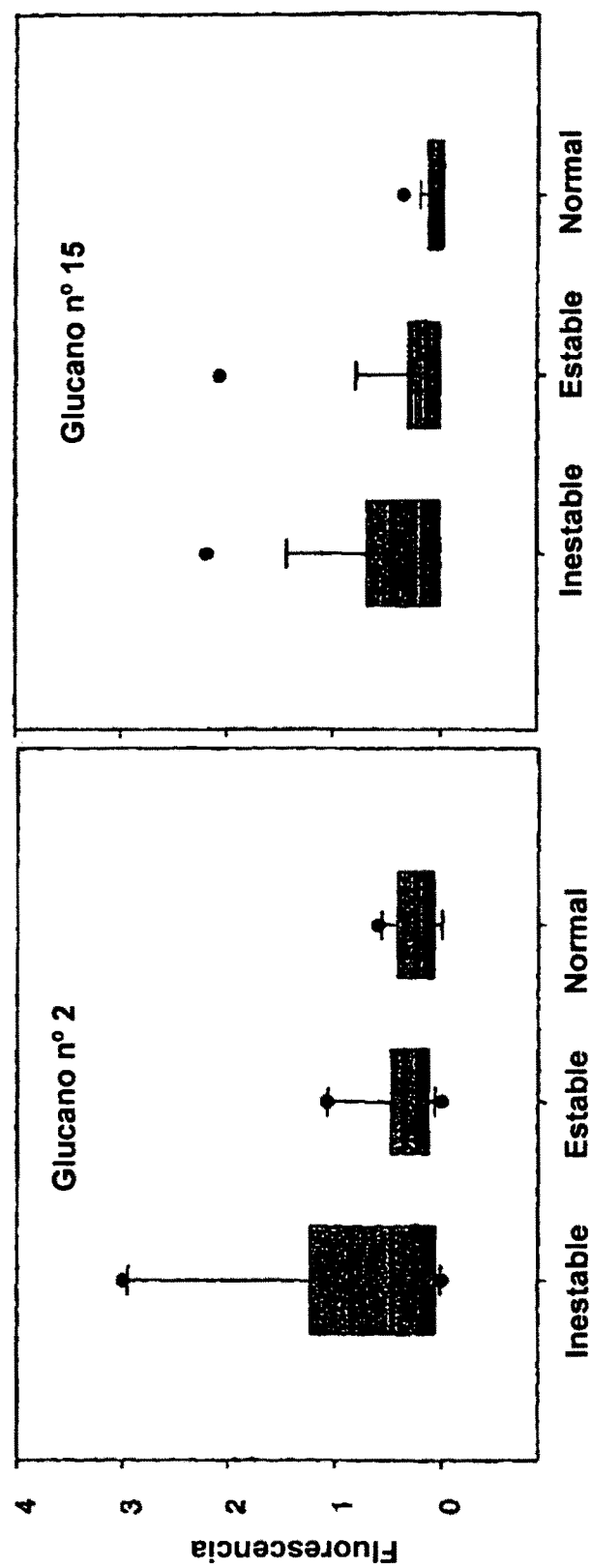


FIG. 18B

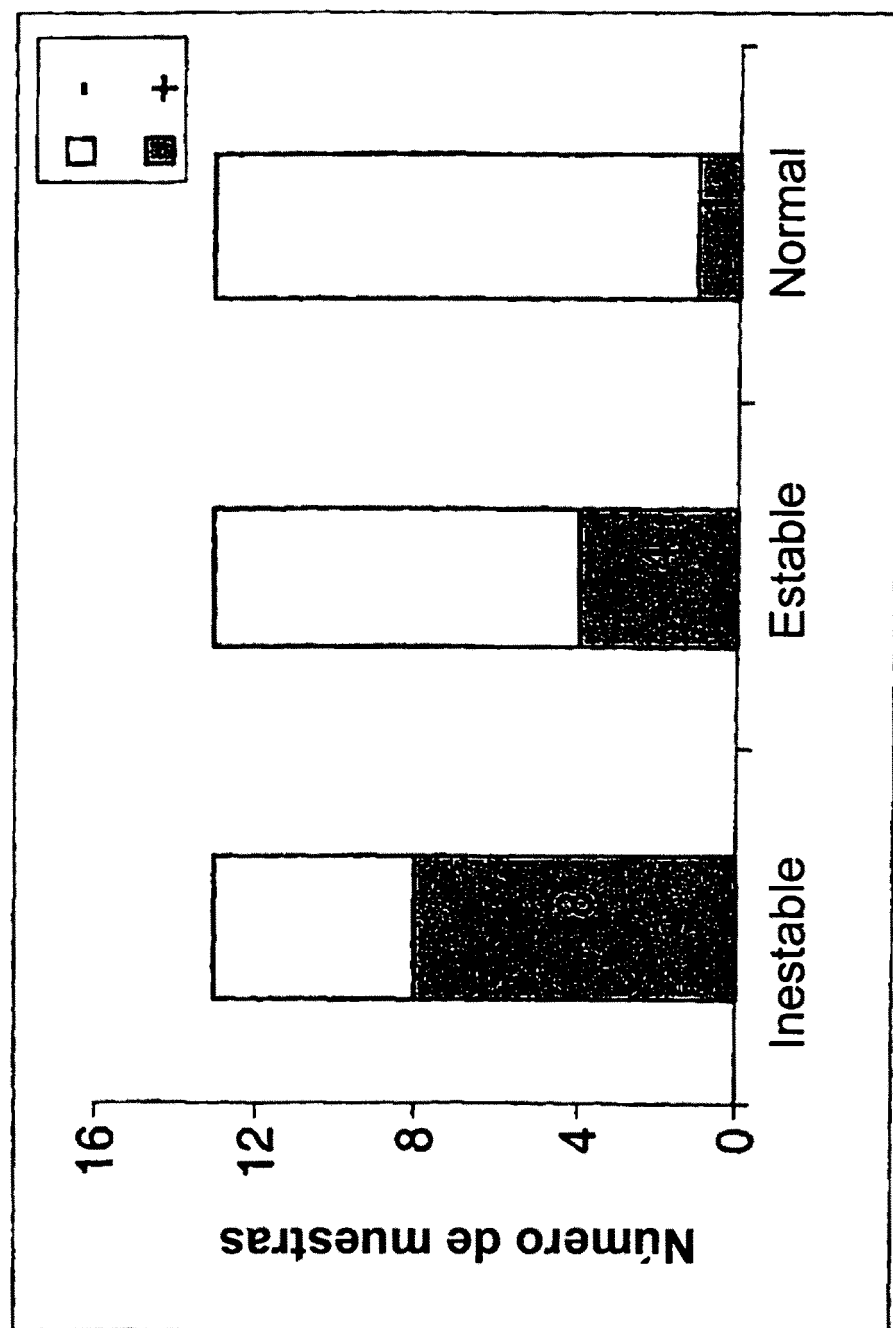
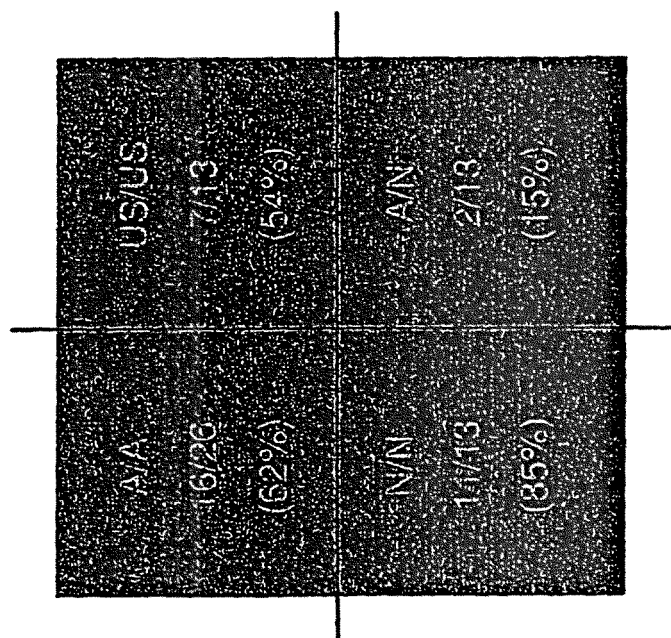


FIG. 19



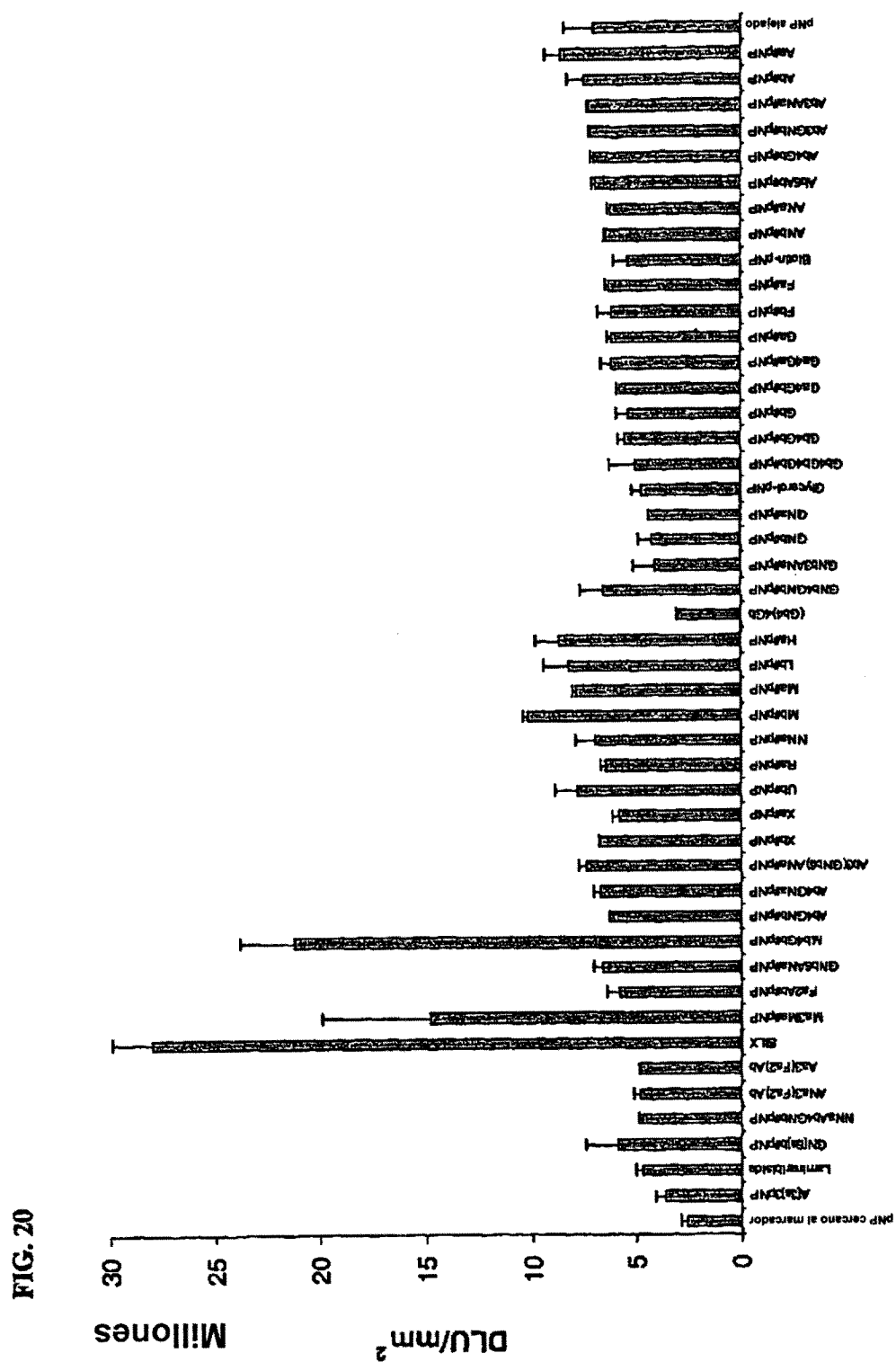


FIG. 21A

Adhesión de células CD4+ de 7 individuos
a glucanos en el GlycoChip

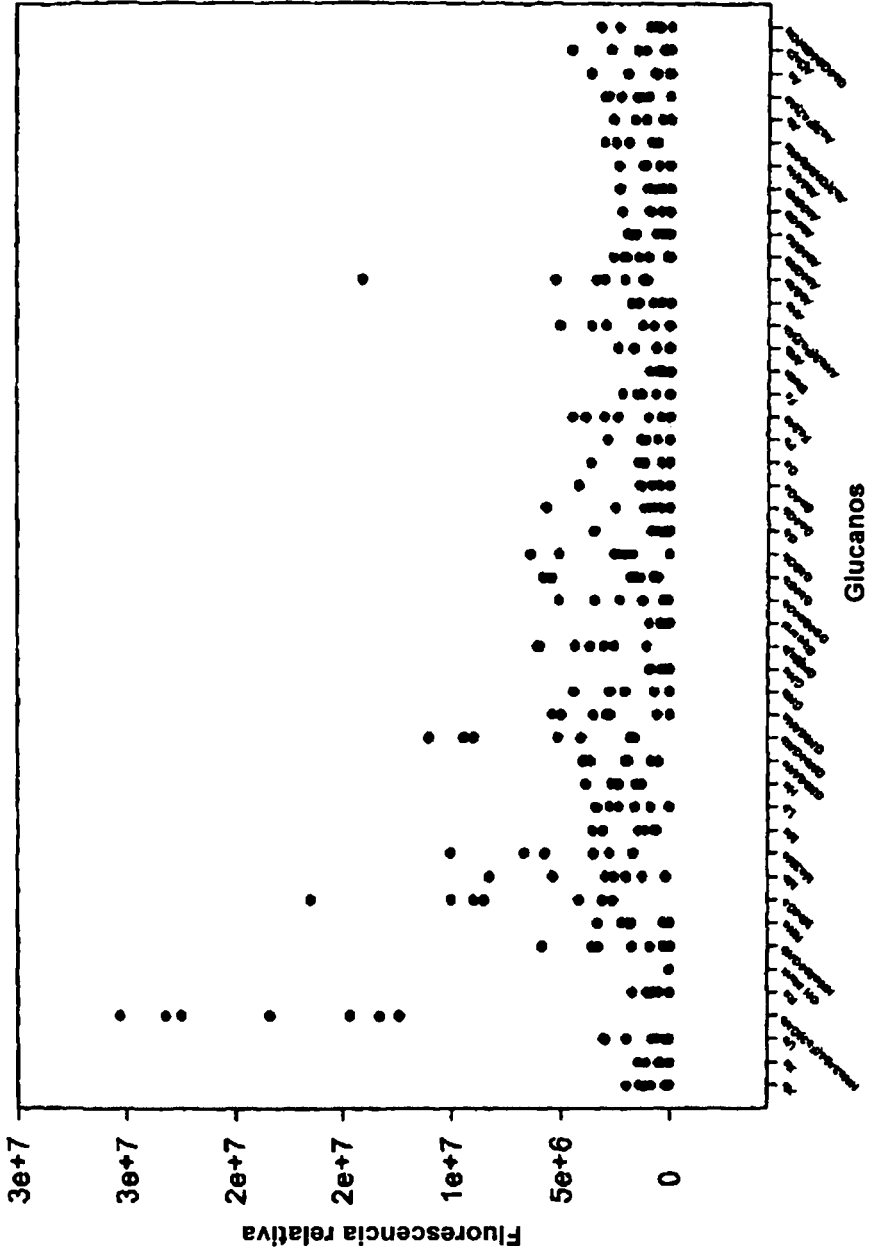


FIG. 21B

