



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 261**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05737324 .3**

(96) Fecha de presentación : **26.04.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1780215**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

(54) Título: **Péptido epitópico de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn y reactivo para ensayar la enfermedad de Crohn.**

(30) Prioridad: **05.08.2004 JP 2004-229171**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2009

(73) Titular/es: **TOAGOSEI Co., Ltd.**
1-14-1, Nishi-Shimbashi
Minato-ku, Tokyo 105-8419, JP
Kurume University

(72) Inventor/es: **Niwa, Mikio;**
Matsuo, Katsuhiko;
Mitsuyama, Keiichi y
Sata, Michio

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Péptido epitópico de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn y reactivo para ensayar la enfermedad de Crohn.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido útil para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn, y a un reactivo de ensayo que contiene el mismo como ingrediente activo. El reactivo de ensayo se puede usar para un método de ensayo de la enfermedad de Crohn, que se puede llevar a cabo conveniente y rápidamente por medio de un proceso inmunológico usando una muestra biológica tal como sangre.

Antecedentes de la técnica

La enfermedad de Crohn, cuya causa es desconocida, se denomina enfermedad inflamatoria del intestino, que incluye así mismo la colitis ulcerosa. Cuando se observan de forma continua dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, fiebre y síntomas similares en individuos jóvenes (al final de los 10 años hasta el principio de los 20 años), se debería de sospechar esta enfermedad. El diagnóstico se basa en una combinación de síntomas clínicos, radiografía, y endoscopia o examen patológico, etcétera. Sin embargo, estas técnicas requieren experiencia y pericia, y por tanto, en algunos casos, el diagnóstico puede ser difícil. En particular, en una etapa temprana de la enfermedad, en muchos casos es difícil distinguir la enfermedad de Crohn de la colitis ulcerosa. Por otro lado, la radiografía intestinal y la endoscopia, que son las técnicas de diagnóstico principales, son desventajosas por cuanto son dolorosas, física o psicológicamente, para los pacientes. En consecuencia, se desea un reactivo y un método para diagnosticar *in vitro* la enfermedad de Crohn de manera conveniente y exacta.

Con respecto a la etiología de la enfermedad inflamatoria del intestino, desde hace tiempo se ha dado a conocer que factores exógenos tales como bacterias, virus y antígenos alimentarios están relacionados con la inflamación intestinal. En cuanto a la enfermedad de Crohn en particular, se han dado a conocer casos de infección y detección de *Mycobacterium paratuberculosis* (documentos 1 a 4 que no son patentes, etcétera), casos de detección de anticuerpos contra levadura de cocina y neutrófilos (documentos 5 y 6 que no son patentes, etcétera), y casos de detección de un anticuerpo contra amilasa de cerdo, o de detección de un anticuerpo contra un péptido que se une a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn (véanse los documentos 1 y 2 de patentes). Algunos de estos también dieron a conocer anticuerpos específicos contra la enfermedad, pero ninguno de ellos mostró por sí mismo un porcentaje suficiente de positivos para pacientes con enfermedad de Crohn, planteando un problema de una elevada tasa de falsos positivos para colitis ulcerosa, que se debe de discernir de ella. En estas circunstancias, es extremadamente importante desarrollar un método de ensayo clínico mediante el cual se pueda diagnosticar específicamente la enfermedad de Crohn de manera conveniente y rápida con elevada exactitud utilizando un péptido antigénico específico de la enfermedad de Crohn.

Documento 1 de patente: Patente Japonesa abierta al público (Kokai) n° H11-190734 (Reivindicaciones).

Documento 2 de patente: Publicación Internacional WO 02/088175 (Descripción de la invención).

Documento 1 que no es patente: **Elsaghier A, et al. Clin Exp Immunol.**, 1992, 90, 503-508.

Documento 2 que no es patente: **El-Zaatari F. A. et al. Curr Microbiol.**, 1999, 39, 115-119.

Documento 3 que no es patente: **Naser S, et al. Vet Microbiol.**, 2000, 77, 497-504.

Documento 4 que no es patente: **Suenaga K, et al. Dig Dis Sci.**, 1999, 44, 1202-1207.

Documento 5 que no es patente: **Quinton J F, et al. Gut**, 1998, 42, 788-791.

Documento 6 que no es patente: **Peeters M, et al. Am J Gastroenterol.**, 2001, 96, 730-734.

Descripción de la invención**Problemas a resolver por la invención**

En las circunstancias descritas anteriormente, el objeto de la presente invención es proporcionar un péptido epitópico que se une específicamente a un anticuerpo que se observa específicamente en pacientes con enfermedad de Crohn y, de este modo, que es característico de la enfermedad de Crohn; un reactivo de ensayo y un kit de ensayo que contienen el péptido como ingrediente activo; y un método de ensayo para examinar conveniente y rápidamente si los pacientes están afectados o no por la enfermedad de Crohn, mediante el uso de estos.

Medios para resolver los problemas

A fin de resolver los problemas descritos anteriormente, se han realizado estudios inmunológicos y de biología molecular, y se ha descubierto que ciertos péptidos reconocen específicamente y se unen a anticuerpos específicos que están presentes en sueros de pacientes con enfermedad de Crohn. Se ha confirmado que, mediante el uso de estos péptidos, se puede determinar conveniente y exactamente si los pacientes están afectados por la enfermedad de Crohn. En consecuencia, la presente invención se define mediante los siguientes apartados (1) a (4):

- (1) Un péptido característico de un epítipo para un anticuerpo de la enfermedad de Crohn, que se representa mediante los siguientes apartados (a) o (b):
 - (a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, o una sal del mismo; y
 - (b) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 3, en la que uno o algunos de los aminoácidos están sustituidos, suprimidos o añadidos, o parte de la secuencia de aminoácidos modificada o no modificada de SEQ ID NO: 3, y que tiene la propiedad de unirse a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn que se une al péptido (a) anterior, o una sal del mismo.
- (2) Un reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende, como ingrediente activo, el péptido (a) o (b) anterior característico de un epítipo para un anticuerpo de la enfermedad de Crohn.
- (3) Un kit de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende el reactivo de ensayo anterior para la enfermedad de Crohn como una sustancia antigénica para un anticuerpo de la enfermedad de Crohn.
- (4) Un método de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende la etapa de determinar si está presente o no en una muestra biológica un anticuerpo que se une al péptido (a) o (b) anterior.

En lo sucesivo, las abreviaturas de aminoácidos, péptidos, secuencias de bases, etc., se indican en esta memoria descriptiva según las reglas de IUPAC e IUB, "la Guía para preparar memorias descriptivas, etc., que contienen secuencias de bases o secuencias de aminoácidos" (editada por la Oficina de Patentes Japonesa), y los símbolos convencionales usados en la técnica.

Además, un anticuerpo de la enfermedad de Crohn se refiere aquí a un anticuerpo que se genera en un organismo vivo que sufre la enfermedad de Crohn, y de este modo que es característico de la enfermedad de Crohn como se describe anteriormente, y por lo tanto significa un anticuerpo que se observa específicamente en pacientes con enfermedad de Crohn, independientemente de los tipos de antígenos causales y de este modo característico de la enfermedad de Crohn.

Efectos de la invención

Según la presente invención, se proporciona un péptido epitópico de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn que se une específicamente a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn que se observa específicamente en pacientes con enfermedad de Crohn, y se incluye en un reactivo de ensayo o en un kit de ensayo para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn. De este modo, también se proporciona un método de ensayo útil para la enfermedad de Crohn, que puede examinar y determinar, de manera conveniente, rápida y exacta, si un paciente está afectado por la enfermedad de Crohn.

Mejor modo para llevar a cabo la invención*1. Péptidos epitópicos de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn*

El péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención se puede ejemplificar específicamente mediante un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3.

Además del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención puede ser un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en la que uno o algunos (dos o más) de los aminoácidos están sustituidos, o suplementados con otro aminoácido, o suprimidos. De este modo, el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención engloba el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que está modificada con la sustitución, supresión o adición de uno o más aminoácidos en cada una de estas secuencias de aminoácidos, o que tiene una parte de tales secuencias de aminoácidos, en tanto que el péptido tenga la propiedad de unirse específicamente al anticuerpo de la enfermedad de Crohn.

Todos los péptidos descritos anteriormente se caracterizan por unirse específicamente al anticuerpo de la enfermedad de Crohn.

No hay ninguna restricción particular en el grado, sitio o similar, de la sustitución, supresión o adición de aminoácidos, en tanto que el péptido modificado se caracterice por unirse específicamente al anticuerpo de la enfermedad de Crohn de forma comparable al péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3.

5 Aunque la modificación (mutagénesis) de secuencias de aminoácidos se produce debido a mutación, modificación postraduccional, o similar, se puede inducir de forma artificial. Los métodos para la modificación (mutagénesis) de secuencias de aminoácidos son técnicas bien conocidas en la técnica, que incluyen técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis específica del sitio (Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); Ditto, 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); Zoku Seikagaku Jikken Koza 1 "Idenshi Kenkyuho II" en transliteración
10 Japonesa, que significa Sequel Biochemical Experiment Lecture 1, "Gene Study Methodology II", así como técnicas de síntesis química tales como el método de fosfotriéster y el método de fosforamidito (J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); Ditto, 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); Ditto, 24, 245 (1983)).

15 Además, en el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención, ejemplificado por el péptido de la secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NO: 3, el C-terminal puede ser cualquier grupo carboxido (-COOH), grupo amida (-CONH₂), y grupo éster (-COOR). Aquí, R en el grupo éster incluye, por ejemplo, grupos alquilo C₁₋₆, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo; grupos cicloalquilo C₃₋₈, tales como ciclopentilo y ciclohexilo; y grupos arilo de C₆₋₁₂, tales como fenilo y α -naftilo.

20 Cuando un péptido usado en la presente invención tiene un grupo carboxilo en un sitio distinto del C-terminal, tal grupo carboxilo se puede amidizar o esterificar, y tal péptido también está incluido en el péptido de la presente invención. Tales ésteres incluyen en este caso, por ejemplo, los descritos anteriormente para los ésteres C-terminales.

25 Además, los péptidos de la presente invención también incluyen aquellos en los que un grupo aminoácido del resto de aminoácido en el N-terminal está protegido por un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo formilo y un grupo acetilo); aquellos en los que un resto de glutamina en el N-terminal generado por escisión en el organismo vivo se cambia por ácido piroglutámico; aquellos en los que un sustituyente (por ejemplo, un grupo hidroxilo, grupo mercapto, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, y grupo guanidino) en una cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido por un grupo protector adecuado; y péptidos complejos tales como los
30 denominados glucopéptidos, que tiene una cadena de azúcar unida a los mismos.

Puesto que se cree que el número mínimo de aminoácidos requeridos para el reconocimiento por el anticuerpo es cuatro desde el punto de vista inmunológico, el número de aminoácidos del péptido epitópico descrito anteriormente del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención descrito anteriormente es cuatro o más, pero
35 no tiene ningún límite superior particular en tanto que tenga la propiedad de unirse específicamente a y reconocer el anticuerpo de la enfermedad de Crohn observado en pacientes con enfermedad de Crohn. El número de aminoácidos generalmente es de cuatro hasta alrededor de 500 desde el punto de vista de síntesis química, tal como síntesis peptídica.

40 Las sales de los péptidos de la presente invención incluyen sales fisiológicamente aceptables con ácidos o bases. Los ejemplos de tales sales incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido sulfúrico; y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maléico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y ácido benceno-sulfónico. Además, se incluyen, por ejemplo, sales con
45 metales alcalinos tales como sodio y potasio; sales con metales alcalino-térreos tales como magnesio y calcio; sales con aminas tales como monometilamina y trietilamina; sales con amonio cuaternario tales como trimetiletilamonio y tetrametilamonio.

Más adelante se describen con detalle procedimientos de preparación o producción en relación con el péptido
50 epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención, o una sal del mismo (en lo sucesivo también denominada colectivamente como el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn), incluyendo un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, o una sal del mismo, así como un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 3, en la que uno o algunos (dos o más) de los aminoácidos están sustituidos, suprimidos o añadidos, y que tiene la propiedad de unirse específicamente
55 a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn, o una sal del mismo.

2. Preparación del péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn

El péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención se puede obtener
60 mediante una técnica de detección usando una librería de fagos de presentación (una genoteca, una librería de ADNc, o una librería peptídica al azar). Tal técnica de detección se denomina la técnica de presentación de fagos, y es usada por muchos de los expertos en la técnica como un medio conocido para fusionar una proteína de revestimiento de fagos con un epítipo antigenoso extraño y expresar el epítipo sobre la superficie del fago, seguido de la selección con una sonda tal como un anticuerpo (Scott J. K. y Smith G. P., Science, 249, 386-390 (1990); Dybwad A., *et al*, Clin
65 Exp Immunol, 102, 438-442 (1995); Bluthner M., *et al*, J Immunol Methods, 198, 187-198 (1996)).

Los fagos usados para librerías incluyen fagos filamentosos (M13, f1, fd, f1f, etc.: Smith G. P., *et al*, Science, 228, 1315-1317 (1985); Devlin J. J., *et al*, Science, 249, 404-406 (1990); Cwirla S. E., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,

6378-6382 (1990)); fagos λ (Maruyama I. N., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 8273-8277 (1994); Santi E., *et al*, J. Mol Biol, 296, 497-508 (2000)); y fagos T7 (Patente U.S. n° 5.766.905; Novagen T7 Select System Manual TB178 (2000)). Las proteínas como librería son inducidas para ser expresadas sobre la superficie del fago mediante genomas clonantes, ADNc u oligonucleótidos al azar en la dirección 5' o en la dirección 3' del gen que codifica una proteína de revestimiento de fagos mediante uso de una técnica de manipulación génica bien conocida para expresarlas como proteínas de fusión capsídicas que entonces se pueden usar como una librería genómica, una librería de ADNc, o una librería de péptidos al azar, respectivamente.

Entre los métodos específicos para obtener el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn usando la técnica de detección, en la presente invención es adecuado el siguiente método que usa una librería de ADNc.

En primer lugar, el ARN total se extrae de células cultivadas, tales como células de cáncer de colon, y el ARN poli (A)⁺ se purifica con una columna oligo(dT). A partir de esto, se sintetiza un ADNc monocatenario usando un oligonucleótido al azar (preferiblemente con alrededor de ocho bases) y transcriptasa inversa. Después, se sintetiza ADNc bicatenario usando ARNasaH y ADN polimerasa de *E. coli*, se une a secuencias ligadoras, y se digiere posteriormente con enzima de restricción para obtener ADNc bicatenario que tiene extremos cohesivos. Finalmente, se escinde un ADN fágico mediante la misma enzima de restricción, y se liga con el ADNc anterior mediante ADN ligasa, para construir una librería de ADNc según un método de empaquetamiento *in vitro*.

La librería de ADNc resultante se añade a una microplaca, microperlas, o similar, a la que el anticuerpo del suero del paciente con enfermedad de Crohn se inmovilizó previamente vía la Proteína G o similar para capturar fagos que se unen específicamente al anticuerpo del suero del paciente con enfermedad de Crohn. No hay ninguna restricción particular para el anticuerpo del suero de paciente con enfermedad de Crohn a inmovilizar en una microplaca o similar, en tanto que sea capaz de unirse al menos a un antígeno. Por ejemplo, se puede usar el propio suero recogido de un paciente con enfermedad de Crohn. Además, tal suero se puede precipitar con una disolución de sulfato de amonio, o se puede purificar con Proteína A antes del uso.

Los fagos que no son de interés, que no se unen o que se unen débilmente, se eliminan por lavado, y tal procedimiento se repite varias veces, y después el anticuerpo inmovilizado del suero de paciente con enfermedad de Crohn y los fagos se disocian mediante dodecilsulfato de sodio (en lo sucesivo, abreviado como SDS) o similar, de forma que se puedan eluir los fagos capaces de unirse al anticuerpo de la enfermedad de Crohn en un suero de paciente con enfermedad de Crohn.

A fin de seleccionar adicionalmente fagos que tienen una especificidad por el anticuerpo del suero de paciente con enfermedad de Crohn, se infecta un hospedante de *E. coli* con la suspensión fágica eluída anterior, y se deja que forme placas individuales en un medio de LB agar que contiene un inductor de la expresión de proteínas (isopropil- β -D(-)-tiogalactopiranosido, etc.). Estas placas se transfieren a una membrana de microcelulosa, etc., y se someten a inmunotinción usando un suero de paciente con enfermedad de Crohn, de forma que se puedan especificar y aislar los fagos que se unen al anticuerpo del suero de paciente con enfermedad de Crohn.

Los fagos resultantes se inmovilizan en una microplaca o similar vía un anticuerpo antifágico, y se hacen reaccionar con sueros procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn, procedentes de pacientes con colitis ulcerosa, y procedentes de población sana, de forma que los fagos que reaccionan específicamente con el anticuerpo del suero de pacientes con enfermedad de Crohn se puedan seleccionar basándose en su reactividad (en lo sucesivo denominado también aquí como ELISA fágico). Específicamente, los fagos obtenidos anteriormente se inmovilizan haciéndolos reaccionar con un anticuerpo antifágico inmovilizado a un soporte dado, tal como una microplaca. Los fagos inmovilizados se hacen reaccionar con sueros procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn así como con sueros de control, tales como sueros procedentes de población sana, sueros procedentes de pacientes con colitis ulcerosa o con otras enfermedades tales como enfermedad autoinmunitaria, cáncer de colon, enteritis aguda, úlcera gástrica y úlcera duodenal, de forma que los fagos que reaccionan específicamente con los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn se puedan seleccionar basándose en su reactividad.

A partir de los fagos seleccionados mediante la detección por el ELISA fágico descrito anteriormente, se extraen y se purifican los ADN, y las secuencias de bases de los ADNc insertados se pueden determinar mediante el método dideoxi o similar. Basándose en la secuencia de bases resultante, se puede determinar una secuencia de aminoácidos, y de este modo se puede obtener el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención mediante una síntesis química general y similar, incluyendo síntesis peptídica mediante un método en fase líquida o un método en fase sólida.

Específicamente, basándose en la secuencia de aminoácidos determinada, la síntesis química es posible mediante el método de alargamiento por etapas o de condensación de fragmentos. Los métodos conocidos convencionalmente se pueden usar para la eliminación, condensación, y similar, del grupo protector de aminoácidos usados en la síntesis peptídica, a fin de preparar un péptido de interés. Los ejemplos incluyen aquellos métodos descritos en las siguientes publicaciones: M. Bodanszky y M. A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Interscience Publishers, New York, 1966; Schroeder and Luebke, "The Peptide", Academic Press, New York, 1965; Nobuo Izumiya, *et al.*, "Pepuchido Gosei No Kiso To Jikken" en transliteración japonesa, que significa Foundation and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen, 1975; Haruaki Yajima y Shunpei Sakakibara, "Seikagaku Jikkenn Koza 1, Tanpakushitsu No Kagaku IV" en transliteración japonesa, que significa Biochemical Experiment Lecture 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977; Haruaki Yajima,

ed., "Zoku Iyakuhi No Kaihatsu Vol. 14, Pepuchido Gosei" en transliteración japonesa, que significa Sequel Drug Development, Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Publishing.

Adicionalmente, basándose en la secuencia de aminoácidos determinada, se pueden preparar péptidos modificados artificialmente, en los que se sustituyen, suprimen o añaden uno o más aminoácidos. Específicamente, se pueden preparar mediante técnicas de ingeniería genética, tales como mutagénesis específica del sitio, y técnicas de síntesis química conocidas convencionalmente, tales como el método de fosforomidito como se describe anteriormente. Estos péptidos modificados se pueden usar como el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención.

Además, basándose en la secuencia de aminoácidos determinada, se pueden buscar en las bases de datos secuencias peptídicas homólogas. Un péptido altamente homólogo, o una proteína que contiene tal péptido, se puede preparar mediante una técnica de biología molecular conocida, el cual se puede usar como el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención.

El péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención obtenido como se describe anteriormente se puede aislar y purificar mediante una combinación de métodos de separación y purificación de proteínas o péptidos convencionalmente conocidos. Estos métodos de separación y purificación conocidos incluyen aquellos que usan la solubilidad, tales como precipitación con sales y precipitación con disolventes; aquellos que usan principalmente la diferencia de pesos moleculares, tales como diálisis, ultrafiltración y filtración en gel; aquellos que usan la diferencia de cargas, tales como cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida; aquellos que usan la afinidad específica, tales como la cromatografía de afinidad; aquellos que usan diferencia de hidrofobia, tales como la cromatografía de líquidos de altas prestaciones de fase inversa; y aquellos que usan la diferencia del punto isoelectrico, tal como enfoque isoelectrico. Además, la composición de aminoácidos de un péptido purificado se puede medir y analizar fácilmente usando un analizador de aminoácidos.

Cuando un péptido obtenido mediante el método anterior está en forma libre, se puede convertir en una sal adecuada mediante un método conocido o un método equivalente al mismo. Por el contrario, cuando un péptido se obtiene como una sal, se puede convertir en una forma libre u otra sal mediante un método conocido o un método equivalente al mismo.

3. Un reactivo de ensayo, un kit de ensayo, y un método de ensayo para la enfermedad de Crohn

El péptido epitópico obtenido anteriormente del anticuerpo de la enfermedad de Crohn tiene la propiedad de unirse específicamente al anticuerpo de la enfermedad de Crohn en sueros de pacientes con enfermedad de Crohn. Aprovechando tal propiedad de unión, se proporciona un reactivo de ensayo, un kit de ensayo, y un método de ensayo para la enfermedad de Crohn, los cuales emplean tal péptido como ingrediente activo.

Específicamente, se proporciona 1) un reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende como ingrediente activo un péptido epitópico descrito anteriormente del anticuerpo de la enfermedad de Crohn; 2) un kit de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende el reactivo de ensayo descrito en el apartado 1) anterior; 3) un método de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende una etapa de detección de la ausencia o presencia de un anticuerpo que se une específicamente a al menos un péptido de los péptidos epitópicos anteriores del anticuerpo de la enfermedad de Crohn, o una sal del mismo, en una muestra biológica; y 4) un método de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende la etapa de usar el reactivo de ensayo o kit de ensayo anterior.

1) Un reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn

Cuando el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn se usa como ingrediente activo, el ingrediente activo específico es al menos un péptido o una sal del mismo seleccionado del grupo que consiste en (a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, o una sal del mismo; y (b) un péptido o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos modificada representada por SEQ ID NO: 3 en la que uno o mas aminoácidos están sustituidos o suplementados con otro aminoácido, o suprimidos, o comprende una parte de tal secuencia de aminoácidos, y tiene la propiedad de unirse específicamente al anticuerpo en sueros de pacientes con enfermedad de Crohn.

Como el ingrediente activo del reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn, los péptidos epitópicos anteriores del anticuerpo de la enfermedad de Crohn se pueden usar de forma individual o en cualquier combinación de dos o más.

El reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención se puede usar como un antígeno que se une específicamente al anticuerpo de la enfermedad de Crohn, de forma que se pueda llevar a cabo la detección, captura, y similar, del anticuerpo de la enfermedad de Crohn. Para cubrir el alcance de estos fines, el ingrediente activo puede ser no sólo los péptidos epitópicos anteriores del anticuerpo de la enfermedad de Crohn, sino también una forma marcada (un péptido marcado), en el que el péptido se marca con algún compuesto marcador. Además, el reactivo de ensayo puede contener otros componentes.

Como el compuesto marcador de los péptidos anteriores, se puede usar un compuesto marcador usado habitualmente en la técnica, y los ejemplos específicos del mismo incluyen radioisótopos tales como ^3H , ^{14}C , ^{131}I , y $^{99\text{m}}\text{Tc}$; enzimas tales como β -galactosidasa, β -glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa; sustancias fluorescentes tales como fluorescamina e isotiocianato de fluoresceína; y sustancias luminiscentes tales como luciferina, derivados de luminol y derivados de isoluminol.

Usando un péptido de la presente invención, que está marcado con una enzima, un radioisótopo o similar, se puede llevar a cabo la detección, captura, y similar del anticuerpo de la enfermedad de Crohn. Además, como se describirá con detalle más adelante, como reactivo de ensayo se puede usar también un péptido de la presente invención sin marcarlo, utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo, tal como un radioinmunoensayo y un inmunoensayo enzimático.

2) Un kit para la enfermedad de Crohn

Cuando la enfermedad de Crohn se ensaya usando una muestra biológica tal como sangre (suero o plasma) de un sujeto, es fácil y conveniente hacer uso de un kit de ensayo que contiene el reactivo anterior, que comprende como ingrediente activo el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn.

El kit de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención puede usar no sólo un péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención, sino también una forma marcada (un péptido marcado), en la que el péptido se marca con algún compuesto marcador como se describe anteriormente, en tanto que el kit de ensayo contenga el reactivo de ensayo anterior, a fin de permitir que el reactivo se una al anticuerpo de la enfermedad de Crohn. Además, el péptido se puede usar en una forma inmovilizada, inmovilizando previamente el péptido a un soporte dado (una fase sólida).

Además del reactivo anterior, un kit de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención puede usar opcionalmente otros reactivos, dependiendo de los tipos de métodos de inmunoensayo y de detección empleados o adaptados para el ensayo de la enfermedad de Crohn que se describirán más adelante. Por ejemplo, cuando el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn se usa en una forma marcada con un radioisótopo, se requiere un dispositivo de detección de la radiactividad, tal como un contador de centelleo de líquidos; y cuando se usa en una forma marcada con una enzima, una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente, se requiere un dispositivo de detección correspondiente. Por lo tanto, en el presente kit de ensayo están contenidos como otros ingredientes un reactivo de detección, un disolvente, un material base y similar requeridos para cada fin.

Especialmente, el kit de ensayo de la presente invención contiene preferiblemente un anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG humana, por ejemplo anticuerpo de ratón anti-IgG humana) para detectar inmunoglobulina humana (también denominada IgG humana), como ingrediente distinto del reactivo de ensayo anterior que comprende como ingrediente activo el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn. El anticuerpo anti-IgG humana se puede marcar con un compuesto marcador descrito anteriormente, o se puede inmovilizar previamente a un soporte dado (una fase sólida).

Además, el kit de ensayo puede incluir un sustrato enzimático o una enzima requerida por el compuesto marcador; un reactivo de detección para detectar una reacción entre el compuesto marcador y el sustrato enzimático; y otros, para llevar a cabo convenientemente la medida, incluyendo diversas muestras adecuadas, disoluciones diluyentes para los reactivos, el anticuerpo secundario o similar, un anticuerpo estándar, una disolución tampón, una disolución de lavado, una disolución de sustrato enzimático, y una disolución de terminación de la reacción. Además, cuando el reactivo de ensayo anterior o el anticuerpo anti-IgG humana no está marcado o inmovilizado, el kit de ensayo puede incluir, como otro componente, un compuesto marcador descrito anteriormente o un soporte (fase sólida).

El kit de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención es una combinación del reactivo de ensayo anterior, que comprende como ingrediente activo el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn (péptido el cual puede estar inmovilizado y/o marcado), con al menos uno seleccionado de forma arbitraria de un anticuerpo anti-IgG humana (que es el anticuerpo secundario que puede estar inmovilizado y/o marcado); un sustrato requerido por un compuesto marcador (un sustrato enzimático cuando el compuesto marcador es una enzima; una enzima cuando el compuesto marcador es una sustancia fluorescente o una sustancia luminiscente, etc.); una disolución diluyente del anticuerpo; un anticuerpo estándar; una disolución tampón; una disolución de lavado; una disolución de sustrato enzimático; una disolución de terminación de la reacción; un soporte (una fase sólida); y un compuesto marcador. En el kit de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención, es preferible usar una enzima como el compuesto marcador, desde el punto de vista de operabilidad, seguridad, sensibilidad y exactitud de medida, y similar.

3) Un método de ensayo para la enfermedad de Crohn

En el método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención se puede usar como muestra una muestra biológica de un sujeto para examinar si cada sujeto está afectado o no por la enfermedad de Crohn. Específicamente, el hecho de que cada sujeto esté afectado o no por la enfermedad de Crohn se examina usando, como marcador, un cierto anticuerpo que está presente específicamente en muestras biológicas de pacientes con enfermedad de Crohn. La muestra incluye diversas muestras biológicas tales como sangre (suero o plasma), orina, sudor, saliva, semen y fluido de la médula espinal de un sujeto (humano), y es preferiblemente un suero o plasma.

El método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención se caracteriza porque como sustancia antigénica se usa el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn. Específicamente, cuando el anticuerpo de la enfermedad de Crohn está presente en una muestra biológica del sujeto, forma un complejo con el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn como antígeno, debido a una reacción antígeno-anticuerpo. Detectando y midiendo tal complejo, se diagnostica la aparición o no de la enfermedad de Crohn y similar.

Los métodos para detectar el complejo producido por la reacción entre el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn como antígeno y el anticuerpo de la enfermedad de Crohn característico de pacientes con la enfermedad de Crohn pueden ser métodos convencionalmente conocidos. Sus ejemplos incluyen radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, inmunocromatografía, y similares. Cuando estos ensayos inmunológicos se usan para el método de ensayo de la presente invención, no se requieren condiciones, operaciones, o similares, especiales. El sistema de medida se puede construir usando condiciones y operaciones habituales de cada técnica, junto con consideraciones tecnológicas generales dadas por el experto en la técnica. Para una descripción detallada de tales técnicas generales, se hace referencia a repasos y libros. Por ejemplo, se pueden citar Hiroshi Irie, ed., "Radioimmunoassay" (Kodansha, 1964); Hiroshi Irie, ed., "Sequel Radioimmunoassay" (Kodansha, 1979); Eiji Ishikawa, *et al.*, ed., "Koso Meneki Sokuteiho" en transliteración japonesa, que significa Enzyme Immunoassay (Igakushoin, 1978); Eiji Ishikawa, *et al.*, ed., "Koso Meneki Sokuteiho" en transliteración japonesa, que significa Enzyme Immunoassay (2ª ed.) (Igakushoin, 1982); Eiji Ishikawa, *et al.*, ed., "Koso Meneki Sokuteiho" en transliteración japonesa, que significa Enzyme Immunoassay (3ª ed.) (Igakushoin, 1987).

Además, en el método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención, preferiblemente se usa el reactivo de ensayo o el kit de ensayo anterior, que comprende, como ingrediente activo, el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn.

Específicamente, como el método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención, se pueden emplear diversos ensayos inmunológicos que utilizan como sustancia antigénica el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn. Por ejemplo, refiriéndonos a un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (en lo sucesivo también denominado ELISA) en fase sólida, que usa como muestra un suero humano, el anticuerpo de la enfermedad de Crohn a examinar se puede detectar y medir mediante el siguiente método.

En primer lugar, el péptido epitópico anterior del anticuerpo de la enfermedad de Crohn como la sustancia antigénica se inmoviliza a un soporte o similar, al que se añade como muestra una muestra biológica. Si el anticuerpo de la enfermedad de Crohn está presente en la muestra, se une al péptido inmovilizado. Después, el anticuerpo de la enfermedad de Crohn presente en la muestra se puede detectar y medir llevando a cabo una segunda reacción antígeno-anticuerpo, una detección, y similar, usando un reactivo de detección tal como un anticuerpo anti-IgG humana (incluyendo el anticuerpo secundario uno marcado con una sustancia marcadora) que se une específicamente a IgG humana.

Como alternativa, un reactivo de detección, tal como un anticuerpo anti-IgG humana, se puede inmovilizar previamente al soporte, al que se añade una muestra de forma que se capture el anticuerpo de la enfermedad de Crohn en una muestra biológica. Después, añadiendo como sustancia antigénica el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn anterior, también se puede detectar y medir el anticuerpo de la enfermedad de Crohn presente en la muestra. La selección de diversos medios para estas técnicas de ensayo, modificaciones de las mismas, y similares, son bien conocidos por los expertos en la técnica, y de este modo todos ellos se pueden usar en la presente invención (véase "Rinsho Kensaho Teiyo" en transliteración japonesa, que significa Laboratory Test Methods Synopsis, Kanehara, 1995; etc.).

No hay ninguna restricción particular en los reactivos de detección, tales como un anticuerpo anti-IgG humana, para detectar el anticuerpo de la enfermedad de Crohn, y se pueden usar diversos reactivos comercialmente disponibles usados habitualmente. Por ejemplo, preferiblemente se usan anticuerpos anti-IgG humana que se unen específicamente a IgG humana, los cuales se pueden obtener sensibilizando especies no humanas tales como ratón, conejo, cabra y cerdo con IgG humana como antígeno. Estos anticuerpos anti-IgG humana e IgG humana se pueden marcar con un compuesto marcador descrito anteriormente. El compuesto marcador usado para este marcaje incluye los compuestos marcadores descritos anteriormente. Particularmente, se prefieren aquellos marcados con compuestos marcadores tales como enzimas. Estos anticuerpos anti-IgG humana e IgG humanas marcados están comercialmente disponibles, pero se pueden preparar según métodos normales.

En el método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención, preferiblemente se emplean inmunoensayos enzimáticos, tales como ELISA, que usa una enzima como compuesto marcador como se describe anteriormente, desde los puntos de vista de operabilidad, seguridad, sensibilidad y exactitud de la medida, y similar. Los compuestos marcadores para el marcaje de la enzima incluyen los descritos anteriormente. Además, los métodos de marcaje que usan estos compuestos marcadores de enzimas pueden ser métodos conocidos convencionalmente (Eiji Ishikawa, *et al.*, "Koso Meneki Sokuteiho" en transliteración japonesa, que significa Enzyme Immunoassay, 2ª ed., Igakushoin, 1982; etc.).

Además, cuando en el ensayo anterior se emplea un método en fase sólida, no hay ninguna restricción particular con respecto a los soportes, en tanto que sean portadores insolubles e inertes, y se puedan usar generalmente los empleados de forma habitual. Sus ejemplos incluyen microplacas, perlas, membranas, barritas, tubos de ensayo y

similares, que están hechos de materiales tales como vidrio, Sephadex®, Sepharosa®, y resinas plásticas (poliestireno, polipropileno, policarbonato, etcétera).

Además, el péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención como el antígeno, o el anticuerpo anti-IgG humana como el anticuerpo secundario, se puede hacer insoluble mediante adsorción física. También se pueden hacer insolubles mediante un método que se basa en la unión química, que se emplea generalmente para hacer insolubles o inmovilizar proteínas, enzimas o similares.

En el ELISA anterior, se hace reaccionar una muestra con el péptido epitópico inmovilizado del anticuerpo de la enfermedad de Crohn (la reacción primaria), y después el anticuerpo anti-IgG humana marcado se hace reaccionar con aquel (la reacción secundaria), seguido de la medida de la actividad del compuesto marcado sobre el portador inmovilizado. De ese modo, se puede detectar o cuantificar el anticuerpo de la enfermedad de Crohn contenido en la muestra. La reacción primaria y la reacción secundaria se pueden llevar a cabo al mismo tiempo, o a cierto intervalo. Los métodos para el marcaje e inmovilización pueden ser similares a los descritos anteriormente. Además, en el inmunoensayo mediante ELISA, el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte, o el anticuerpo marcado, no debería ser necesariamente de un tipo, sino que puede ser una mezcla de dos o más tipos de anticuerpos con el fin de aumentar la sensibilidad de la medida, etc.

Los disolventes usados en el sistema de medida anterior pueden ser los empleados habitualmente, en tanto que no afecten a las reacciones, y sus ejemplos incluyen disoluciones tampón de pH de alrededor de 6 a 9, tal como una disolución tampón de fosfato (en lo sucesivo abreviada como PBS), una disolución tampón de borato, una disolución tampón de tris-HCl, una disolución tampón de citrato y una disolución tampón de acetato; y aquellas disoluciones tampón que contienen un tensioactivo tal como Tween® 20 y Triton®-100, un estabilizante tal como seroalbúmina bovina (en lo sucesivo abreviada como BSA) y proteína láctea, o un conservante tal como NaN₃.

No hay ninguna restricción en las condiciones de reacción inmunitaria, y se adaptan condiciones habituales usadas generalmente para inmunoensayos. En general, las condiciones pueden ser a una temperatura de alrededor de 4 a 40°C durante alrededor de 0,5 a 24 horas.

En los procedimientos anteriores, el ensayo para el complejo (que incluye uno en una forma marcada con un compuesto marcado) que resulta de la reacción antígeno-anticuerpo se puede llevar a cabo mediante un método adecuado para el tipo del compuesto marcador en uso. Por ejemplo, cuando el compuesto marcador es una enzima, la actividad enzimática de la forma marcada se puede medir según un método conocido adecuado para el tipo de la enzima en uso.

El ensayo para tal actividad enzimática se puede llevar a cabo mediante un método usado ampliamente, en el que se añade un sustrato adecuado para la enzima, por ejemplo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (abreviada como TMB) u o-fenilendiamina (abreviada como OPD) para peroxidasa, o fosfato de p-nitrofenilo (abreviado como pNPP) para fosfatasa alcalina, y se hace reaccionar durante un intervalo de tiempo dado, seguido de la medida, mediante un espectrofotómetro o similar, del color generado.

El método de ensayo para la enfermedad de Crohn según la presente invención se resume a continuación:

<1> El péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn como un antígeno se inmoviliza en cada pocillo de una microplaca. Habitualmente, los sitios de unión no específica en el pocillo se bloquean con una proteína tal como BSA y caseína, o un tensioactivo tal como Tween® 20;

<2> Las muestras (muestras de suero o de plasma) se diluyen con una disolución tampón (una disolución que diluye la muestra) que contiene opcionalmente una proteína tal como BSA y caseína, o un tensioactivo tal como Tween® 20, y después se añade a la microplaca inmovilizada anterior, para efectuar de ese modo la reacción antígeno-anticuerpo (la reacción primaria);

<3> La microplaca se lava con una disolución tampón (una disolución de lavado) que contiene preferiblemente un tensioactivo tal como Tween® 20, y entonces se diluye el anticuerpo anti-IgG humana marcado con una disolución tampón (la disolución diluyente) que contiene una proteína tal como BSA y caseína, o un tensioactivo tal como Tween® 20, y se añade a aquella para efectuar la reacción antígeno-anticuerpo (la reacción secundaria); y

<4> Después de que la microplaca se lava con la disolución de lavado anterior, se lleva a cabo un ensayo adecuado para el marcador, esto es, se mide la radioactividad para el radiomarcado, y se mide la actividad enzimática para el marcado enzimático.

En lo sucesivo, se ilustran ejemplos de trabajo para explicar la presente invención adicionalmente con detalle, pero la presente invención no se debería de considerar que está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Selección e identificación de péptidos epitópicos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn

1) *Preparación de una librería de presentación de fago de ADNc usando el fago T7*

Se extrajo y se purificó ARN total de alrededor de 10^8 células cultivadas de Caco-2 (Carcinoma de colon humano; RIKEN CELL BANK) usando un kit de extracción de ARN de Qiagen, para obtener $654\text{ }\mu\text{g}$ del ARN total. Usando una columna de oligo(dT)-celulosa, se purificaron $22,8\text{ }\mu\text{g}$ de poli(A)⁺ ARN a partir de $600\text{ }\mu\text{g}$ del ARN total, y después se sintetizó un ADNc monocatenario usando un oligómero al azar (nnnnnnCG) y transcriptasa inversa (Omni-RT de Qiagen).

Después, usando ARNasaH y ADN polimerasa I de *E. coli*, se sintetizó ADNc bicatenario, al cual entonces se le despuntaron sus extremos mediante T4 ADN polimerasa. Después de que el ADNc se metilase mediante metilasa, las secuencias ligadoras (oligoADN de 18 mers) se ligaron mediante T4 ADN ligasa, y después los extremos del ADNc se escindieron mediante enzimas de restricción (EcoRI y NotI), seguido de la filtración en gel con una columna de giro (de Clontech) para eliminar los ligadores sin reaccionar y pequeños fragmentos escindidos.

Se escindió un vector fágico de T7 (de Novagen) mediante las mismas enzimas de restricción, al que se ligaron mediante T4 ADN ligasa los fragmentos de ADNc obtenidos anteriormente. Para formar las partículas fágicas se usó esta disolución de ligación y un kit de empaquetamiento *in vitro* del fago T7 (de Novagen), con las cuales se infectó entonces el hospedante *E. coli* BLT 5615 para permitir su amplificación. Se preparó una librería de ADNc que tiene un tamaño de alrededor de $1,3 \times 10^7$.

2) *Detección de fagos antigénicos que se unen al anticuerpo del suero de pacientes con enfermedad de Crohn*

Se inoculó una única colonia del hospedante *E. coli* BLT 5615 en un medio LB que contiene 50 g/ml de ampicilina para llevar a cabo el cultivo a 37°C hasta que la turbidez a 600 nm fue de 0,5. A esta disolución de cultivo de *E. coli* se añadió isopropil- β -D(-)-tiogalactopiranosido (en lo sucesivo abreviado como IPTG), a la concentración final de 1 mM, para llevar a cabo el cultivo a 37°C durante 30 min. Después, se le añadió la librería de ADNc preparada en 1), o una librería de ADNc comercialmente disponible derivada de cáncer de colon, para continuar el cultivo a 37°C hasta que se produjese la lisis total. Inmediatamente después de la lisis, la mezcla se enfrió en hielo, seguido de la centrifugación para eliminar fragmentos celulares lisados, y de ese modo se obtuvo un sobrenadante. A este sobrenadante se añadió tampón de leche (un tampón de tris-HCl 25 mM (que contiene 137 mM de NaCl, y 2,68 mM de KCl; pH 7,4) (en lo sucesivo abreviado como TBS) que contiene 5% de leche desnatada y 0,1% de Tween[®] 20) del volumen equivalente para obtener una disolución de fagos lisados que se usó en el siguiente procedimiento.

A una microplaca (de Dynatec Lab.) se añadió Proteína G (de Sigma), diluida con PBS hasta 20 $\mu\text{g/ml}$, para que reaccionase a 4°C toda la noche. Después de la reacción, la microplaca se lavó con un tampón de leche, y después se bloqueó con el mismo tampón para preparar una placa unida a la Proteína G.

Se obtuvieron muestras séricas procedentes de 21 pacientes con enfermedad de Crohn. A partir del conjunto de sueros, se obtuvo el equivalente sérico en volumen de una a tres muestras de pacientes, y se diluyó con PBS que contiene 0,05% de NaN₃, que entonces se añadió a la placa unida a la Proteína G. La placa se dejó reposar a 22°C durante 2 h, de forma que los anticuerpos en el suero se uniesen a la placa, seguido del lavado tres veces con un tampón de leche para preparar una placa unida a anticuerpos de sueros de pacientes con enfermedad de Crohn.

A la placa unida a anticuerpos de sueros de pacientes con enfermedad de Crohn se añadió la disolución de fagos lisados anteriores (un título de fagos de alrededor de 1×10^{11} pfu), que entonces se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 3 h para permitir que los fagos que expresan los anticuerpos se unan a aquella. La placa se lavó con un tampón de leche y TBS para eliminar la suspensión de fagos no unidos, y después se añadió PBS que contiene 0,5% de SDS y se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos para eluir los fagos unidos, y de ese modo se obtuvo un eluato de fagos.

3) *Inmunotinción de placas de fagos y aislamiento de fagos antigénicos que se unen al anticuerpo del suero de pacientes con enfermedad de Crohn*

Con el eluato de fagos así obtenido, se infectó el hospedante *E. coli* BLT 5615, que entonces se inoculó en un medio de LB agar que contiene 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 1 mM de IPTG para llevar a cabo el cultivo a 37°C durante 3 h, y de ese modo se formaron placas. Las placas resultantes se dejaron reposar a 4°C durante 1 h, las cuales se cubrieron entonces con una membrana de microcelulosa (de Osmonics). La membrana se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para transferirles las partículas fágicas.

La membrana se bloqueó con un tampón de leche, y después se empaparon en un suero de pacientes con enfermedad de Crohn diluido con el mismo tampón, que entonces se agitó suavemente a 4°C toda la noche. Esta membrana se lavó tres veces con un tampón de leche, y después se empapó en una disolución en la que se diluyeron anticuerpos monoclonales anti-IgG humana marcados con fosfatasa alcalina (de Sigma) hasta 1/5000 con el mismo tampón, seguido de la agitación suave a temperatura ambiente durante 1 h.

ES 2 328 261 T3

Esta membrana se lavó tres veces con un tampón de leche, después se lavó con 100 mM de tris-HCl (que contiene 100 mM de NaCl y 5 mM de MgCl₂; pH 9,5) (en lo sucesivo abreviado como tampón AP), y después se empapó en un tampón AP que contiene una disolución cromógena (0,33 mg/ml de nitroazultetrazolio (en lo sucesivo abreviado como NBT) y 0,165 mg/ml de fosfato de bromocloroindolilo (en lo sucesivo abreviado como BCIP)) de forma que se generó color a temperatura ambiente.

Las placas de fagos aislados inmunoteñidos se separaron raspando, y se suspendieron en un medio LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina. Una parte del mismo se añadió a una disolución de cultivo del hospedante *E. coli* BLT 5615, para llevar a cabo el cultivo a 37°C hasta que se produjese la lisis total. Esta disolución lisada se centrifugó para eliminar fragmentos celulares lisados, y el sobrenadante resultante se suplementó con CHCl₃ a la concentración final de 0,3%. Este se almacenó a 4°C como una disolución de fagos antigénicos clonados que se unen al anticuerpo de suero de pacientes con enfermedad de Crohn.

4) ELISA de fagos

A una disolución de cultivo del hospedante *E. coli* BLP 5615 se añadieron los fagos antigénicos que se unen al anticuerpo de suero de pacientes con enfermedad de Crohn obtenidos en el apartado 3) anterior, para llevar a cabo el cultivo a 37°C hasta que se produjese la lisis completa. Esta disolución se centrifugó para eliminar los fragmentos celulares lisados, y el sobrenadante resultante se suplementó con un volumen de cuatro veces de un tampón de leche. La disolución resultante se usó para la reacción primaria en el siguiente procedimiento.

A una microplaca se añadieron anticuerpos anti-fago T7 (anticuerpos policlonales de conejo) diluidos con PBS hasta 1 µg/ml para que reaccionen a 4°C toda la noche. Después de la reacción, la microplaca se lavó con un tampón de leche, y después se bloqueó con el mismo tampón para preparar una placa unida a anticuerpos anti-fago T7.

La disolución anterior para la reacción primaria se añadió a la placa unida a anticuerpos anti-fago T7, y se agitó suavemente a 22°C durante 2 h, de forma que los fagos se uniesen a la placa, seguido del lavado tres veces con un tampón de leche. Se le añadieron diversos sueros (derivados de pacientes con enfermedad de Crohn, pacientes con colitis ulcerosa, o personas sanas) que se diluyeron hasta 1/250 con el mismo tampón, y se dejó reposar a 22°C durante 1 h, y después se lavó seis veces con el mismo tampón. Se le añadió una disolución en la que anticuerpos monoclonales anti-IgG humana marcados con fosfatasa alcalina se diluyeron hasta 1/5000 con el mismo tampón, y se dejó reposar a 22°C durante 1 h, y después se lavó seis veces con el mismo tampón. Después, la placa se lavó con tampón AP, y después se suplementó con una disolución de fosfato de p-nitrofenilo (de Sigma) para efectuar la reacción a 22°C durante 40 min. Se añadió una disolución de terminación (NaOH 2N), para terminar la reacción, y después se midió la absorbancia (a 405 nm) mediante un lector de placas, para comparar los títulos de anticuerpos en los sueros. A partir de los resultados de reactividad, se seleccionaron tres clones (por conveniencia, abreviados como CD#47, CD#336, y CD#353) que mostraron especificidades elevadas por los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn.

5) Determinación de secuencias de bases de ADN que codifican los péptidos antigénicos y secuencias de aminoácidos

Con los tres fagos antigénicos anteriores que se unen al anticuerpo del suero de pacientes con enfermedad de Crohn seleccionados mediante ELISA fágico, se infectó el hospedante *E. coli* BLT5615 y después se lisó. De las disoluciones lisadas resultantes, se extrajeron ADN fágicos usando los kits lambda de Quiagen (de Quiagen). Las secuencias de bases de ADNc insertadas de los ADN fágicos se determinaron mediante el método didesoxi. La secuencia de aminoácidos de cada uno de los clones, determinada basándose en la secuencia de bases de ADNc insertada respectiva, se muestra en la Tabla 1 usando un código de una letra.

TABLA 1

Nombre del clon	Longitud de aminoácido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID NO:
CD#47	27	NSVKNEVEEVTFKHTQCLGCFKSGFS	1
CD#336	26	VIPALSEAEAGGSPEVRSSRPAPWIW	2
CD#353	8	MIRGLFPN	3

ES 2 328 261 T3

Cada péptido lineal que tiene la secuencia de aminoácidos de cada uno de los clones (por conveniencia, abreviados como TCP-47, TCP-336, y TCP-353) se sintetizó y se purificó (por Sigma Genosis según demanda). Estos péptidos se usaron como péptidos epitópicos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn en los siguientes experimentos. Las propiedades de cada uno de los péptidos preparados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Nombre del péptido	Longitud de los aminoácidos	Peso molecular	Pureza	Punto isoeléctrico	Hidrofobia
TCP-47	27	3023,3	92,3%	6,97	33,3%
TCP-336	26	2763,1	99,7%	4,61	65,4%
TCP-353	8	947,2	91,0%	10,9	75,0%

En la Tabla 2, la unidad del peso molecular es kDa; la pureza se expresa mediante una relación de área basada en el análisis mediante cromatografía de líquidos (absorbancia a 225 nm); y la hidrofobia es un porcentaje del contenido de aminoácidos hidrófobos.

Ejemplo 2

Reactividad de TCP-47, TCP-336 y TCP-353 con diversas muestras de suero

Se llevó a cabo un ELISA usando como antígenos los péptidos epitópicos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn obtenidos en el Ejemplo 1, para estudiar la reactividad con diversos sueros (procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn, pacientes con colitis ulcerosa, o personas sanas).

A una microplaca, se añadió cada uno de los péptidos diluido con PBS hasta 2 µg/ml y se hizo reaccionar a 4°C toda la noche. Después de la reacción, la microplaca se lavó con un tampón de bloqueo (PBS que contiene 2% de BSA, 5% de sacarosa, y 0,1% de NaN₃), seguido del bloqueo con el mismo tampón para preparar una placa con péptido inmovilizado.

A una placa con péptido inmovilizado, se añadieron diversos sueros (sueros de pacientes con enfermedad de Crohn: 32 muestras, sueros de pacientes con colitis ulcerosa: 32 muestras, y sueros de personas sanas: 32 muestras) que se diluyeron hasta 1/100 con una disolución diluyente de muestras (PBS que contiene 1% de BSA y 0,1% de Tween[®] 20), y se dejó reposar a 22°C durante una hora, seguido del lavado seis veces con un tampón de lavado (PBS que contiene 0,1% de Tween[®] 20). Después, se le añadió un anticuerpo anti-IgG humana marcado con HRP (de Dako) diluido hasta 1/4000 con el mismo tampón, y se dejó reposar a 22°C durante 1 h, seguido del lavado ocho veces con el mismo tampón de lavado. Se le añadió adicionalmente una disolución de TMB (de Dako) como sustrato cromógeno, y se dejó reaccionar a 22°C durante 30 min., y entonces se añadió una disolución de terminación (H₂SO₄ 2N) para terminar la reacción, seguido de la medida de la absorbancia (de 450 a 600 nm) mediante un lector de placas. Los resultados de la medida se muestran en la Figura 1 como un diagrama de dispersión.

Basándose en estos resultados, se llevó a cabo un ensayo de significancia. Se observa una reactividad significativamente mayor con el suero de pacientes con enfermedad de Crohn de los tres péptidos, según se compara con el suero de pacientes con colitis ulcerosa o el suero de personas sanas. Los valores de corte se determinaron como se describe más abajo, y, usando estos, las reacciones positivas se evaluaron para calcular el porcentaje de positivos para los diversos sueros. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Valores de corte:

TCP-47, OD = 0,40: el valor de OD que da la sensibilidad más elevada en el intervalo de especificidad de 0,1 o menos de 1 en la curva característica de funcionamiento del receptor (ROC).

TCP-336, OD = 1,10: lo mismo que antes.

TCP-353, OD = 0,11: la media de los valores medidos de los sueros procedentes de personas sanas más 2SD.

ES 2 328 261 T3

TABLA 3

			TCP-47	TCP-336	TCP-353
5	Porcentaje	Pacientes	40,6%	28,1%	53,1%
	de positi-	con enfer-	(13)	(9)	(17)
10	vos	medad de			
		Crohn (32)			
	Porcentaje	Pacientes	0%	3,1%	3,1%
15	de falsos	con coli-	(0)	(1)	(1)
	positivos	tis ulce-			
20		rosa (32)			
		Personas	9,4%	9,4%	6,3%
		sanas (32)	(3)	(3)	(2)

En la tabla, el número entre paréntesis indica el número de muestras.

Como se muestra en la Tabla 3, el porcentaje de positivos para los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn indicado por TCP-47, TCP-336, y TCP-353 es 40,6%, 28,1%, y 53,1%, respectivamente, mientras que el porcentaje de falsos positivos para los sueros de pacientes con colitis ulcerosa y los sueros de personas sanas fue de 3,1 a 9,4%. Estos resultados demuestran que estos péptidos se unen específicamente a anticuerpos en los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn.

Ejemplo 3

Medida de algunas de las muchas muestras de suero mediante ELISA con TCP-353

TCP-353, cuyo porcentaje de positivos para los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn fue el más elevado (53,1%), y el porcentaje de falsos positivos para los sueros de pacientes con colitis ulcerosa o para los sueros de personas sanas fue bajo (6,3% y 3,1%, respectivamente) en el Ejemplo 2, se usó para medir algunas de las muchas muestras de suero (sueros de pacientes con enfermedad de Crohn: 60 muestras, sueros de pacientes con colitis ulcerosa: 109 muestras, sueros de personas sanas: 71 muestras, sueros de pacientes con enteritis aguda: 11 muestras, sueros de pacientes con cáncer de color: 35 muestras, y sueros de pacientes con hepatopatía crónica: 49 muestras).

La medida se llevó a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 2, excepto que el suero se diluyó hasta 1/400. Además, usando una disolución estándar preparada reuniendo sueros de pacientes positivos, se dibujó una curva estándar, y los valores de la absorbancia resultantes se convirtieron en valores unitarios. Los resultados de la medida se muestran en la Figura 3 como un diagrama de dispersión.

Basándose en estos resultados, se llevó a cabo un ensayo de significancia. Se observó una reactividad de TOP-353 con los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn significativamente mayor que con los sueros de pacientes con colitis ulcerosa, los sueros de personas sanas, los sueros de pacientes con enteritis aguda, los sueros de pacientes con cáncer de colon, y los sueros de pacientes con hepatopatía crónica.

Además, el número de sueros de pacientes positivos y su porcentaje de positivos se muestran en la Tabla 4, con la condición de que el valor de corte se ajustó para que fuese un valor de la media de los valores medidos de las 71 muestras de suero de personas sanas más 3SD.

TABLA 4

		Número de sueros posi- tivos	Porcentaje (%)
5			
10	Porcentaje de positivos	Pacientes con enfermedad de Crohn (60)	37 61,7%
15	Porcentaje de falsos posi- tivos	Pacientes con colitis ulce- rativa (109)	8 7,3%
20		Personas sa- nas (71)	2 2,8%
25		Pacientes con enteritis aguda (11)	0 0%
30		Pacientes con cáncer de co- lón (35)	4 11,4%
35		Pacientes con hepatopatía crónica (49)	4 8,2%
40			

En la tabla, los números entre paréntesis indican el número de muestras.

Como se muestra en la Tabla 4, el porcentaje de positivos para los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn es 61,7% (37/60), mientras que el porcentaje de falsos positivos para los sueros de pacientes con colitis ulcerosa, los sueros de personas sanas, los sueros de pacientes con enteritis aguda, los sueros de pacientes con cáncer de co-ion, y los sueros de pacientes con hepatopatía crónica es 7,3% (8/109), 2,8% (2/71), 0% (0/11), 11,4% (4/35), y 8,2% (4/49), respectivamente. Estos resultados demuestran que el presente método de ensayo se puede usar para detectar la aparición o no de la enfermedad de Crohn, y distinguir la enfermedad de Crohn de otras enfermedades relacionadas, en particular colitis ulcerosa.

Ejemplo 4

60 Comparación entre ELISA con TCP-353 y ASCA-IgG ELISA

Se estudió la reactividad del anticuerpo anti-levadura de cocina (abreviado ASCA-IgG), el cual se ha dado a conocer que está relacionado con la enfermedad de Crohn (Gut, 1998, 42, 788-791; Am J Gastroenterol., 2000, 95, 359-367; Am J Gastroenterol., 2001, 96, 730-734), con diversos sueros, y se comparó con ELISA usando TCP-353 (en lo sucesivo, también denominado TCP-353 ELISA) en términos de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Crohn.

ES 2 328 261 T3

La medida mediante ELISA usando ASCA-IgG (en lo sucesivo, denominado también como ASCA-IgG ELISA) se realizó usando un kit de GENESIS Diagnostics según el manual de instrucciones del mismo. Los resultados de la medida se muestran en la Figura 4 como un diagrama de dispersión. El valor de corte se predeterminó en ASCA-IgG ELISA de forma que la especificidad fue 90%, y se obtuvo el porcentaje de reactividad para cada suero. Los resultados, mediante comparación en el porcentaje de positivos entre ASCA-IgG ELISA y TCP-353 ELISA, se muestran en la Tabla 5.

Además, los valores medidos de los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn mediante ASCA-IgG ELISA y mediante TCP-353 ELISA se representan gráficamente a lo largo de los ejes vertical y horizontal, respectivamente, para obtener un coeficiente de correlación y determinar la ausencia o presencia de correlación entre los dos sistemas de medida. Los resultados se muestran en la Figura 5.

TABLA 5

		ASCA IgG	TCP-353
Sensibilidad	Pacientes con enfermedad de Crohn (60)	31,7%	61,7%
Especificidad		90,9%	93,5%
Porcentaje de falsos positivos	Pacientes con colitis ulcerosa (109)	8,3%	7,3%
	Personas sanas (71)	8,5%	2,8%
	Pacientes con enteritis aguda (11)	9,1%	0%
	Pacientes con cáncer de colon (35)	5,7%	11,4%
	Pacientes con hepatopatía crónica (49)	14,3%	8,2%
Valor predictivo positivo (PPV)		43,2%	67,3%
Valor predictivo negativo (NPV)		85,9%	91,8%
Eficacia de diagnóstico (sensibilidad x especificidad)		0,288	0,576

En la tabla, los números entre paréntesis indican el número de muestras.

En la Tabla 5:

La sensibilidad es un valor calculado mediante la siguiente fórmula: (el número de sueros positivos de pacientes con enfermedad de Crohn) / (el número de sueros procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn medido) X 100;

La especificidad es un valor calculado mediante la siguiente fórmula: {1-(el número de sueros positivos de pacientes sin enfermedad de Crohn) / (el número de sueros de pacientes sin enfermedad de Crohn y de personas sanas medido)} X 100;

Un valor predictivo positivo (PPV) es un valor calculado mediante la siguiente fórmula: (el número de sueros positivos de pacientes con enfermedad de Crohn) / (el número de todos los sueros positivos) X 100;

Un valor predictivo negativo (NPV) es un valor calculado mediante la siguiente fórmula: (el número de sueros negativos de pacientes sin enfermedad de Crohn) / (el número de todos los sueros negativos) X 100.

Los resultados de la Figura 4 y de la Tabla 5 muestran que el ELISA que usa TCP-353 es superior a ASCA-IgG ELISA tanto en sensibilidad como en especificidad, y también tiene mayores valores predictivos positivos y negativos, indicando una mayor exactitud en el diagnóstico. Además, el coeficiente de correlación obtenido a partir de la Figura 5 es 0,229, indicando que no existe correlación entre los dos sistemas de ensayo, lo que sugiere que se mide un anticuerpo diferente mediante cada sistema.

Ejemplo 5

Comparación con péptidos ramificados conocidos que se unen a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn

Se prepararon cuatro tipos de péptidos ramificados (abreviados como cóctel-MAP; documento WO 02/088175 A1), que son péptidos que se unen a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn, para comparación con el ELISA que usa TCP-353 en términos de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Crohn.

El ELISA que usa el cóctel-MAP (denominado también como cóctel-MAP ELISA) se llevó a cabo según la publicación internacional (WO 02/088175A1), excepto que se usó la misma disolución estándar que la empleada en TCP-353 ELISA, y los valores de la absorbancia medidos se convirtieron en valores de índice. Los resultados de la medida se muestran en la Figura 6 como un diagrama de dispersión. Además, el valor de corte se ajustó para que fuese el valor de la media de los valores medidos de las 71 muestras de suero de personas sanas más 3SD, con lo que se obtuvo el porcentaje de reactividad para cada suero.

Los resultados mediante comparación del porcentaje de positivos entre el cóctel-MAP ELISA y TCP-353 ELISA se muestran en la Tabla 6. Además, los valores medidos de los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn mediante cóctel-MAP ELISA y mediante TCP-353 ELISA se representan gráficamente a lo largo de los ejes vertical y horizontal, respectivamente, para obtener un coeficiente de correlación y determinar la ausencia o presencia de correlación entre los dos sistemas de medida. Los resultados se muestran en la Figura 7.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

		cóctel MAP	TCP-353
5	Sensibilidad	55,0%	61,7%
	Pacientes con en-		
	fermedad de Crohn		
10	(60)		
	Especificidad	92,0%	93,5%
15	Porcentaje de	8,3%	7,3%
	falsos posi-		
	tivos		
20	Personas sanas (71)	4,2%	2,8%
	Pacientes con ente-	9,1%	0%
25	ritis aguda (11)		
	Pacientes con cán-	5,7%	11,4%
	cer de colón (35)		
30	Pacientes con hepa-	14,3%	8,2%
	topatía crónica		
35	(49)		
	Valor predictivo positivo (PPV)	60,0%	67,3%
	Valor predictivo negativo (NPV)	90,4%	91,8%
40	Eficacia de diagnóstico (sensibi-	0,506	0,576
	lidad x especificidad)		

En la tabla, los números entre paréntesis indican el número de muestras. PPV, NPV, etc., son como se definen en la Tabla 5.

Los resultados anteriores sugieren que el ELISA que usa TCP-353 es mejor que el cóctel-MAP ELISA en sensibilidad, especificidad y exactitud en el diagnóstico. Además, el coeficiente de correlación obtenido a partir de la Figura 7 es 0,281, indicando que no existe correlación entre los dos sistemas de medida, lo que sugiere que se mide un anticuerpo diferente mediante cada sistema.

Ejemplo 6

Búsqueda de homologías para los péptidos epitópicos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn

Para las secuencias de aminoácidos de los péptidos epitópicos obtenidos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn (TCP-47, TCP-336, y TCP-353), se llevó a cabo la búsqueda BLAST en busca de péptidos o proteínas que tengan secuencias de aminoácidos homólogas. Los resultados se muestran en las Figuras 8, 9, y 10. TCP-47 es idéntico a la región C-terminal de la proteína Titin del ser humano o de la mosca de la fruta, y también se encuentran proteínas homólogas de virus, bacterias, hongos y protozoos. TCP-336 concuerda en gran medida con una proteína humana. TCP-353 es idéntica a una proteína de *Oryza sativa*, sugiriendo una relación entre la enfermedad de Crohn y un antígeno alimentario.

Aplicabilidad industrial

El péptido epitópico del anticuerpo de la enfermedad de Crohn según la presente invención, y el reactivo de ensayo que usa el mismo péptido, hace posible determinar conveniente, rápida y exactamente la aparición o no de la enfermedad de Crohn, y de este modo se puede utilizar para un reactivo de diagnóstico y un método de ensayo los cuales son ambos extremadamente útiles en el diagnóstico de la enfermedad de Crohn.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 son diagramas de dispersión que muestran los resultados de la medida mediante ELISA de la reactividad de los péptidos epitópicos del anticuerpo de la enfermedad de Crohn (TCP-47, TCP-336, y TCP-353) obtenidos en el Ejemplo 1 con sueros de pacientes con enfermedad de Crohn (abreviado como CD) (32 muestras), sueros de pacientes con colitis ulcerosa (abreviado como UC) (32 muestras), y sueros de personas sanas (32 muestras). En la figura, *, **, ***, y **** indican niveles de significancia estadística, cuando la reactividad de cada uno de los péptidos con los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn se comparó con aquella con los sueros de pacientes con colitis ulcerosa o con aquella con sueros de pacientes sanos (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, y ****: $p < 0,0001$; mediante la prueba de la U de Mann-Whitney). Además, las líneas discontinuas indican los valores de corte.

La Figura 2 muestra curvas ROC obtenidas mediante ELISA con TCP-47 o TCP-336, en las que se obtuvieron la sensibilidad y la especificidad de 1 y se representaron gráficamente a lo largo de los ejes vertical y horizontal, respectivamente, basándose en los valores medidos mediante ELISA de las 32 muestras de los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn y las 32 muestras de los sueros de personas sanas. En la figura, las líneas discontinuas indican los valores de corte.

La Figura 3 es un diagrama de dispersión que muestra los resultados de la medida mediante ELISA de la reactividad de TCP-353 con sueros de pacientes con enfermedad de Crohn (CD, 60 muestras), sueros de pacientes con colitis ulcerosa (UC, 109 muestras), sueros de pacientes con enteritis aguda (11 muestras), sueros de pacientes con cáncer de colon (35 muestras), sueros de 1 pacientes con hepatopatía crónica (49 muestras), y sueros de personas sanas (71 muestras). En la figura, ** y **** indican niveles de significancia estadística, cuando la reactividad de TCP-353 con los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn se comparó con aquella con diversos sueros de pacientes y con aquella con los sueros de personas sanas (**: $p < 0,01$, y ****: $p < 0,0001$; mediante la prueba de la U de Mann-Whitney). Además, las líneas discontinuas indican el valor de corte.

La Figura 4 muestra los resultados mediante comparación entre ASCA-IgG ELISA y TCP-353 ELISA, que son diagramas de dispersión que muestran los resultados de la medida mediante ELISA de la reactividad con sueros de pacientes con enfermedad de Crohn (CD, 60 muestras), sueros de pacientes con colitis ulcerosa (UC, 109 muestras), sueros de pacientes con enteritis aguda (11 muestras), sueros de pacientes con cáncer de colon (35 muestras), sueros de pacientes con hepatopatía crónica (49 muestras), y sueros de personas sanas (71 muestras). Además, las líneas discontinuas indican los valores de corte.

La Figura 5 muestra la correlación entre TCP-353 ELISA y ASCA-IgG ELISA. Los valores medidos de los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn mediante ASCA-IgG ELISA y mediante TCP-353 ELISA se representaron gráficamente a lo largo de los ejes vertical y horizontal, respectivamente. La letra r es un coeficiente de correlación.

La Figura 6 muestra los resultados mediante comparación entre TCP-353 ELISA y cóctel-MAP ELISA, que son diagramas de dispersión que muestran los resultados de la medida mediante ELISA de la reactividad con sueros de pacientes con enfermedad de Crohn (CD, 60 muestras), sueros de pacientes con colitis ulcerosa (UC, 109 muestras), sueros de pacientes con colitis ulcerosa (UC, 109 muestras), sueros de pacientes con enteritis aguda (11 muestras), sueros de pacientes con cáncer de colon (35 muestras), y sueros de pacientes con hepatopatía crónica (49 muestras), y sueros de personas sanas (71 muestras). Además, las líneas discontinuas indican los valores de corte.

La Figura 7 muestra la correlación entre cóctel-MAP ELISA y TCP-353 ELISA. Los valores medidos de los sueros de pacientes con enfermedad de Crohn mediante cóctel-MAP ELISA y mediante TCP-353 ELISA se representaron gráficamente a lo largo de los ejes vertical y horizontal, respectivamente. La letra r es un coeficiente de correlación.

La Figura 8 muestra proteínas homólogas en la secuencia de aminoácidos a TCP-47, que se encontraron en las bases de datos de proteínas mediante la búsqueda BLAST. En la figura, | indica que los aminoácidos coinciden, y : indica que los aminoácidos son similares.

La Figura 9 muestra proteínas homólogas en la secuencia de aminoácidos a TCP-336, que se encontraron en las bases de datos de proteínas mediante la búsqueda BLAST. En la figura, | indica que los aminoácidos coinciden, y : indica que los aminoácidos son similares.

La Figura 10 muestra proteínas homólogas en la secuencia de aminoácidos a TCP-353, que se encontraron en las bases de datos de proteínas mediante la búsqueda BLAST. En la figura, | indica que los aminoácidos coinciden, y : indica que los aminoácidos son similares.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido característico de un epítipo de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn, que se representa mediante los siguientes apartados (a) o (b):

(a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3, o una sal del mismo; y

(b) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 3, en la que uno o algunos de los aminoácidos están sustituidos, suprimidos o añadidos, o parte de la secuencia de aminoácidos modificada o no modificada de SEQ ID NO: 3, y que tiene la propiedad de unirse a un anticuerpo de la enfermedad de Crohn que se une al péptido (a) anterior, o una sal del mismo.

2. Un reactivo de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende, como ingrediente activo, el péptido definido en la reivindicación 1.

3. Un kit de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende el reactivo de ensayo definido en la reivindicación 2 como una sustancia antigénica de un anticuerpo de la enfermedad de Crohn.

4. Un método de ensayo para la enfermedad de Crohn, que comprende la etapa de determinar si un anticuerpo que se une al péptido definido en la reivindicación 1 está presente o no en una muestra biológica.

Fig. 1

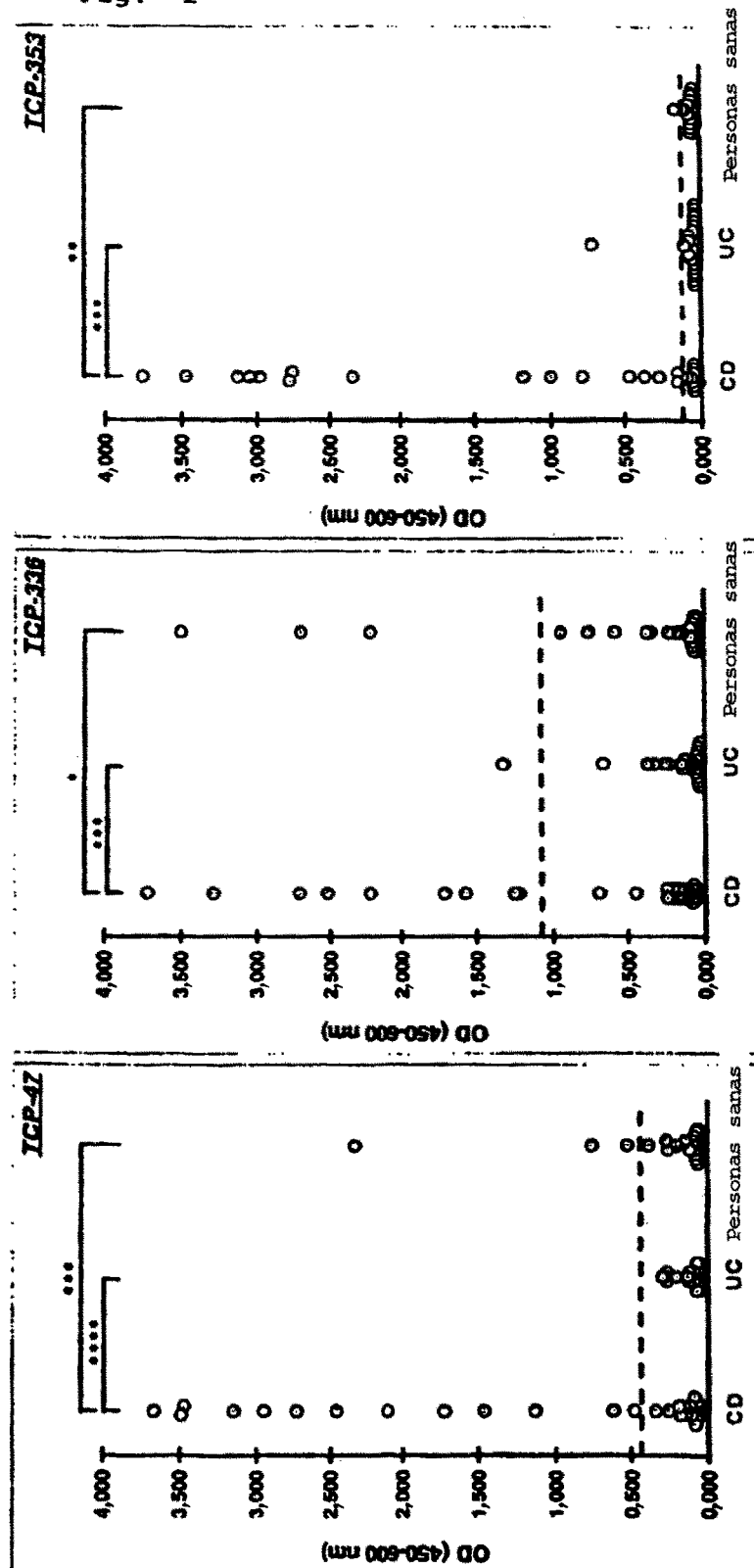


Fig. 2

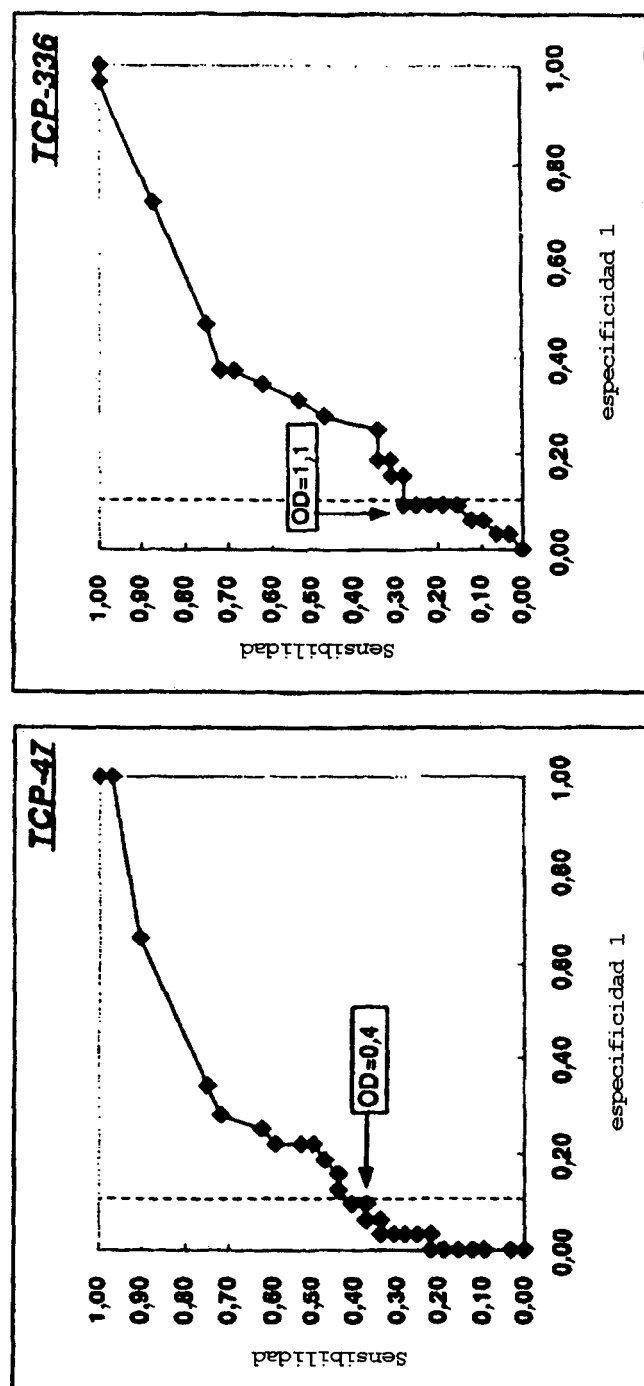


Fig. 3

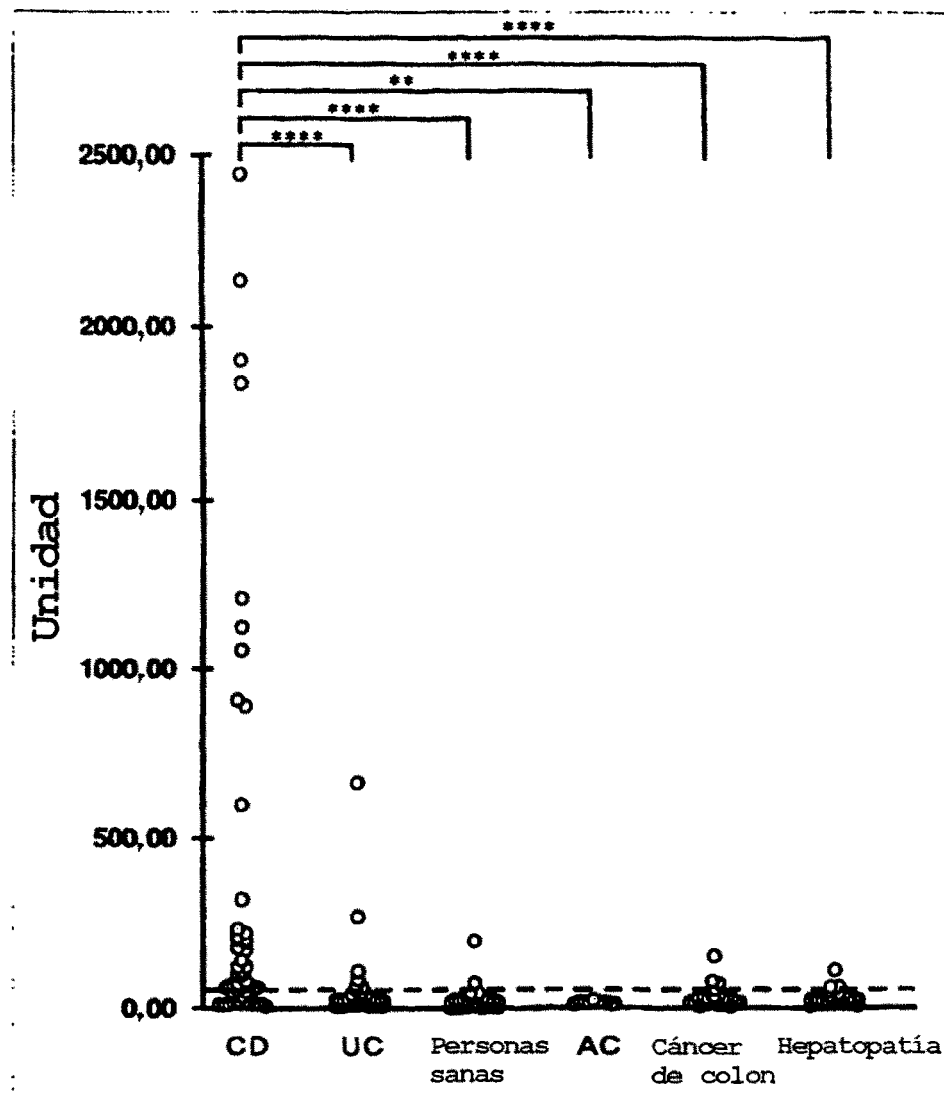


Fig. 4

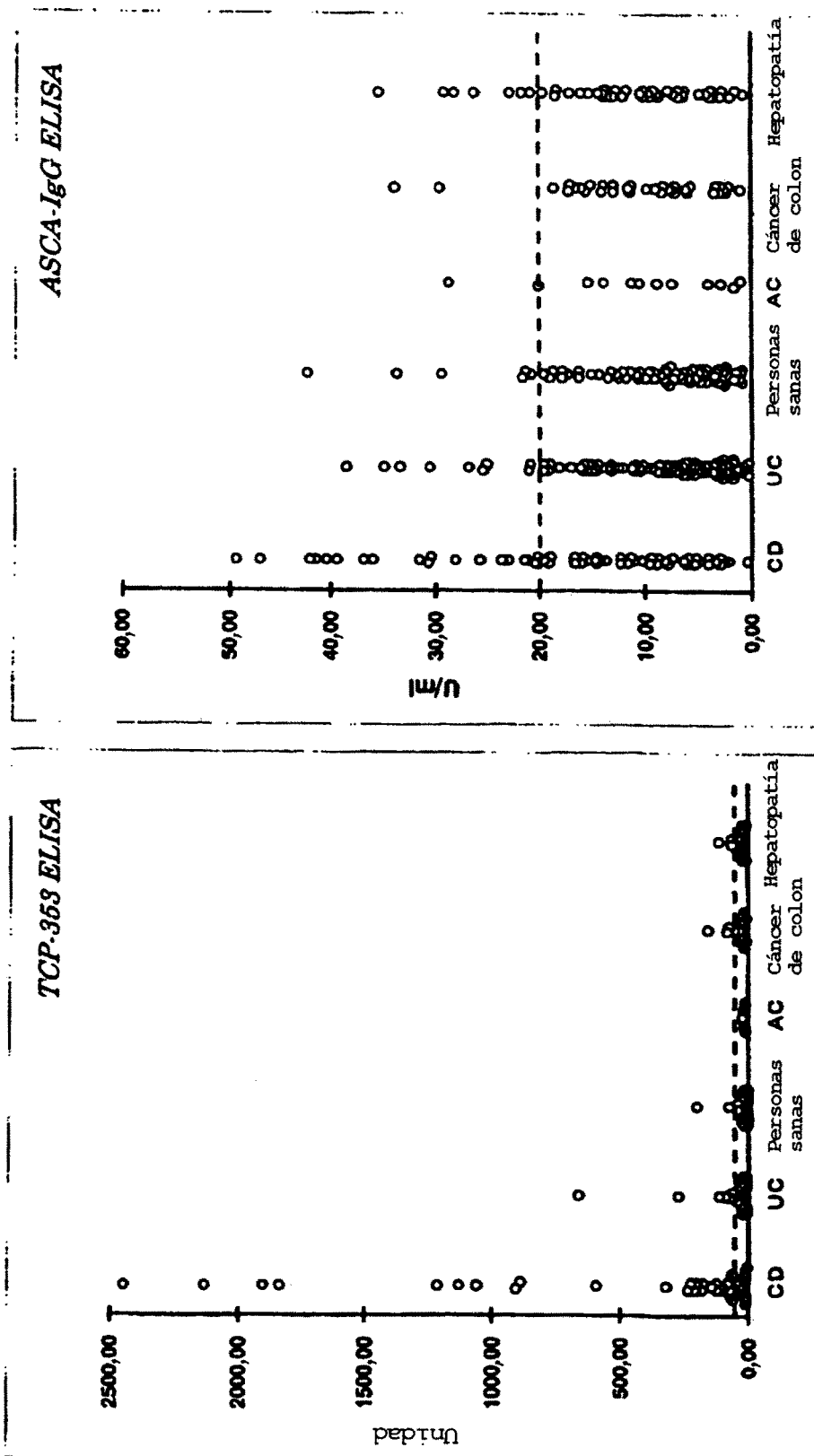


Fig. 5

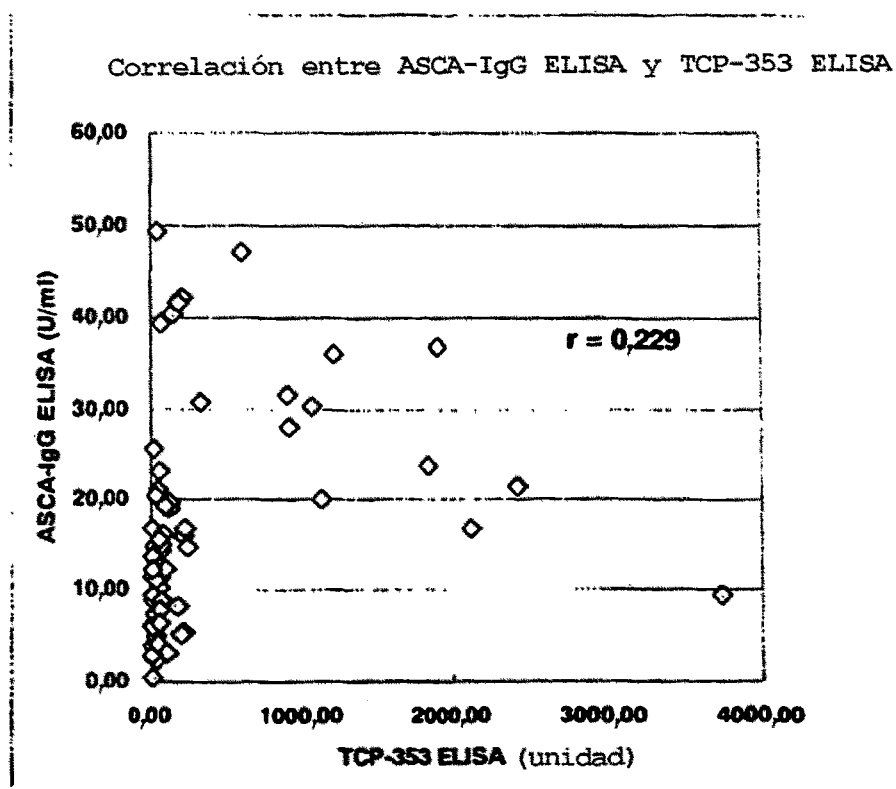


Fig. 6

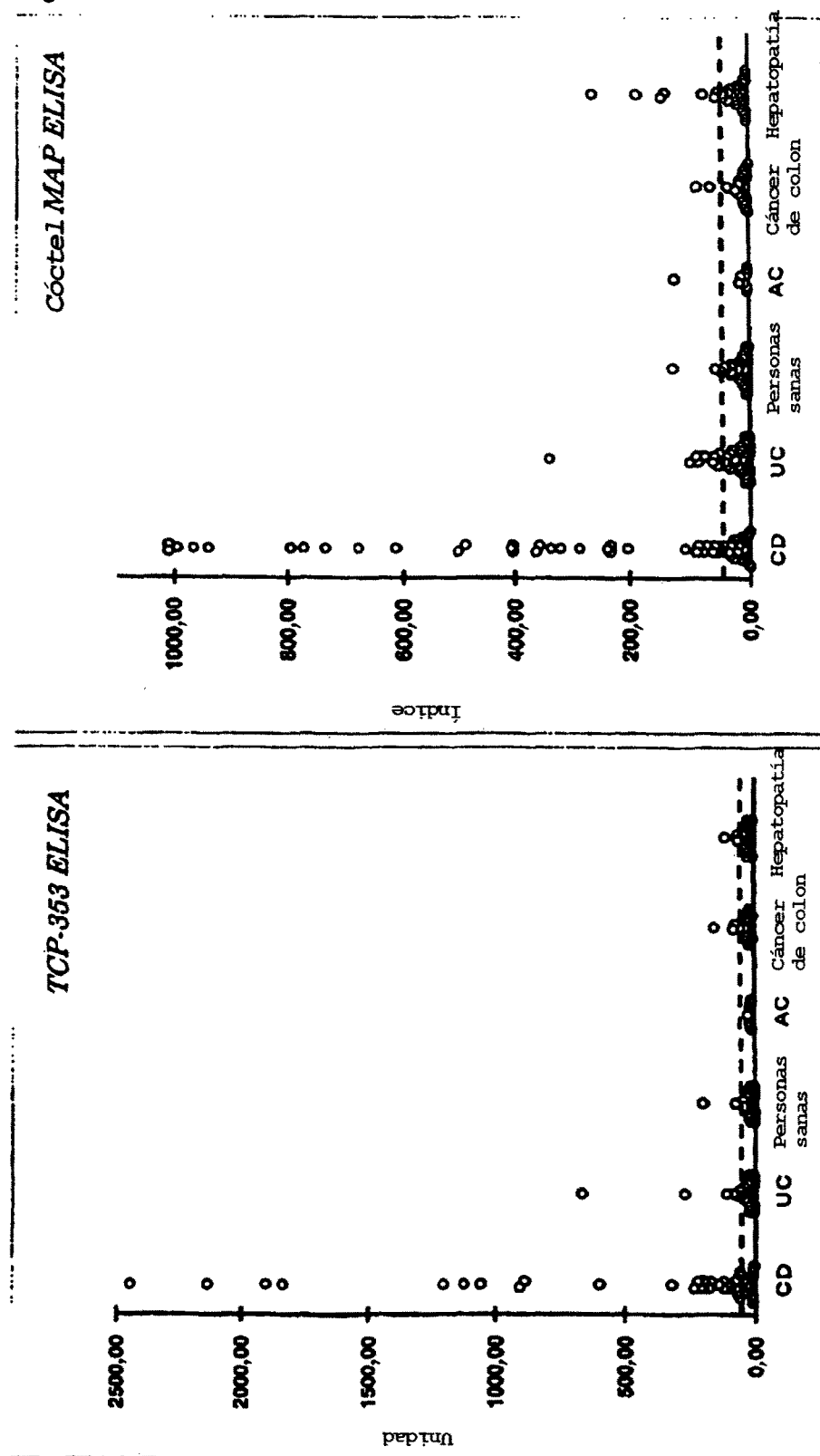


Fig. 7

Correlación entre cóctel-MAP ELISA y TCP-353 ELISA

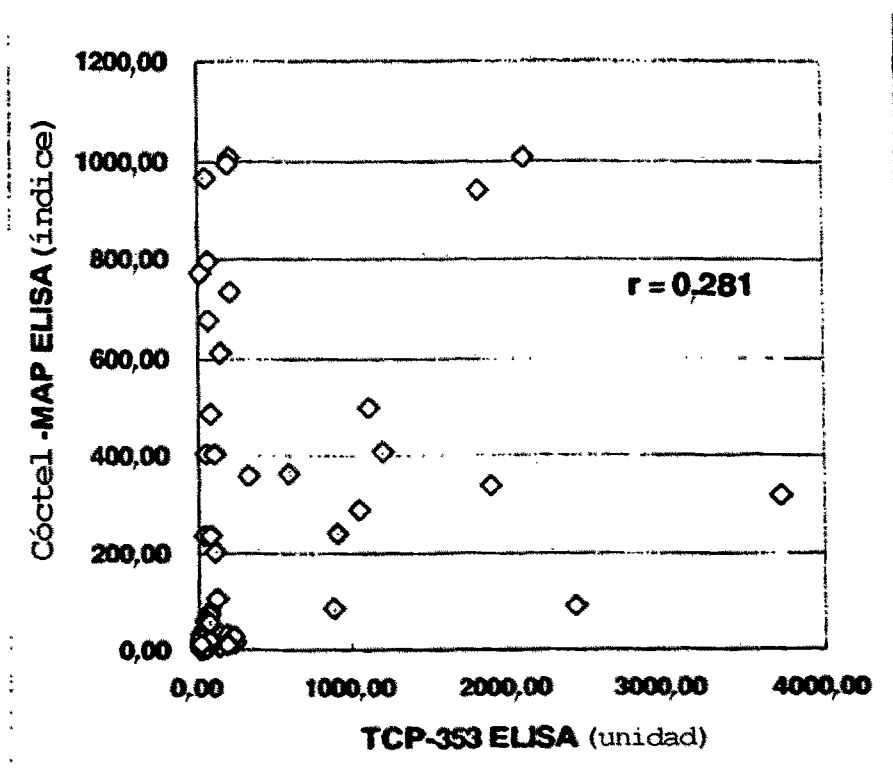


Fig. 8

Resultado de la búsqueda de homologías de -TCP-47-				
N-terminal	secuencia homóloga	C-terminal		
6	EVEVTFPK	14	TCP-47 (27 a.a.)	
	:			
14988	EVDEVTFPK	14996	D-Titin (16215 a.a.) [Drosophila melanogaster]	
7	VE---EVTFTKHTQCLGCFKSGF	26	TCP-47 (27 a.a.)	
308	VERKREVT-----LGCFSDF	323	ADN metiltransferasa Dim-2 (1454 a.a.) [Neurospora crassa]	
6	EVEVTFPKHT	16	TCP-47 (27 a.a.)	
	: : :			
1880	DVDEVAFSKHT	1890	Proteína vírica (2292 a.a.) (virus de la encefalomiocarditis)	
1	NSVKNEVEEVT	11	TCP-47 (27 a.a.)	
	: :			
55	NSVNDVDEST	65	Proteína hipotética (168 a.a.) [Dictyostarium discoideum]	
1	NSVKNEVEEVTFTKH-TQ	17	TCP-47 (27 a.a.)	
	: :			
215	DNVKIEVEEV-INKHITQ	231	Proteína hipotética (249 a.a.) [Trichodesmium erythraeum]	
1	NSVKNEVEEVTFTKHTQ	17	TCP-47 (27 a.a.)	
	: :			
1574	KNVKEVEE---KNSK	1586	Proteína hipotética (3724 a.a.) [Plasmodium falciparum]	
7	VE-EVTFTK-----HTQC	18	TCP-47 (27 a.a.)	
	: :			
140	VECDVFTKDBQKVCNHSQC	159	Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa (458 a.a.) [Rhodospirillum rubrum]	
1	NSVKNEVEEVTFTKHTQCLG	20	TCP-47 (27 a.a.)	
	: :			
64	NSVKDEVKE--FTND---LG	78	Proteína hipotética (417 a.a.) [Pyrococcus horikoshii]	
6	EVEVTF	12	TCP-47 (27 a.a.)	
4939	EVEVTF	4945	Isoforma de nexin-3 titin (5604 a.a.) [Homo sapiens]	

Fig. 9

Resultado de la búsqueda de homologías de -TCP-336-				
N-terminal	Secuencia homóloga	C-terminal		
1	VIPALSEARAGGSPEVRSSRPAMP	24	TCP-336 (26 a.a.)	
80	VIPALWEAEVGGSPPEVRSSRPAMP	103	Proteína sin nombre (124 a.a.) [Homo sapiens]	
1	VIPALSEARAGGSPEVRSSRPAMPIN	26	TCP-336 (26 a.a.)	
293	VIPALWEAEAGGSPEVRSLRPAMPIN	318	Proteína de unión al elemento sensible a cAMP de tipo 1 (318 a.a.) [Homo sapiens]	
1	VIPALSEARAGGSPEVRSSRPAMPIN	26	TCP-336 (26 a.a.)	
	: :			
74	VIPALWEAEAGGLPELRSSRPAMPIN	99	Proteína MOST-1 (99 a.a.) [Homo sapiens]	

Fig. 10

Resultado de la búsqueda de homologías de -TCP-353-			
N-terminal	Secuencia homóloga	C-terminal	
2	IRGLFPN	8	TCP-353 (8 a.a.)
763	IRGLFPN	769	Proteína de canal de cloruro putativa (773 a.a.) [Oryza sativa]
1	MIRGLF----PN	8	TCP-353 (8 a.a.)
98	MIRGLFPVHPN	109	EF-P de la traducción / eIF-5A de la traducción (301 a.a.) [Azotobacter vinelandii]
1	MIRGLFP	7	TCP-353 (8 a.a.)
	:		
16	LIRGLFP	22	Proteína gag de retrotransposón y dedo de Zn (915 a.a.) [Caenorhabditis elegans]
1	MIRGLFPN	8	TCP-353 (8 a.a.)
	:		
95	LIRSLFPN	102	Posible cadena alfa pesada de la dineína (2613 a.a.) [Leishmania major]

ES 2 328 261 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TOAGOSEI CO., LTD

5 <120> PÉPTIDO EPITÓPICO DE UN ANTICUERPO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN Y MÉTODO PARA
DETECTAR LA ENFERMEDAD DE CROHN

<160> 3

10

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

15

<213> librería fágica

<400> 1

20

Asn Ser Val Lys Asn Glu Val Glu Glu Val Thr Phe Thr Lys His Thr
5 10 15
Gln Cys Leu Gly Cys Phe Lys Ser Gly Phe Ser
20 25

<210> 2

25

<211> 26

<212> PRT

<213> librería fágica

30

<400> 2

Val Ile Pro Ala Leu Ser Glu Ala Glu Ala Gly Gly Ser Pro Glu Val
5 10 15
Arg Ser Ser Arg Pro Ala Trp Pro Ile Trp
20 25

35

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

40

<213> librería fágica

<400> 3

45

Met Ile Arg Gly Leu Phe Pro Asn
5

50

55

60

65