



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 822**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05775574 .6**
96 Fecha de presentación : **25.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Procedimiento y dispositivos para el diagnóstico de apendicitis.**

30 Prioridad: **23.07.2004 US 590631 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **ASPENBIO PHARMA, Inc.**
1585 South Perry Street
Castle Rock, Colorado 80104, US

72 Inventor/es: **Colgin, Mark, A.;**
Bealer, John, F.;
Donnelly, Richard y
Newman, Diane

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 822 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y dispositivos para el diagnóstico de apendicitis

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/590631 presentada el 23 de julio de 2004.

Antecedentes de la invención

10 La apendicitis es un problema quirúrgico agudo común que afecta a los seres humanos de un amplio intervalo de edad. Anualmente hay aproximadamente 700.000 casos en los Estados Unidos. Una gran proporción de casos se produce en el grupo de 10 a 30 años. Un diagnóstico preciso en una fase suficientemente temprana es un factor significativo para lograr un resultado satisfactorio.

15 Muchas personas se presentan a su médico con síntomas que sugieren apendicitis, pero producidos por otras enfermedades tales como infecciones víricas. Diferenciar los pacientes con apendicitis de aquellos afectados por otras enfermedades es una desalentadora tarea clínica que afrontan diariamente los médicos. Aunque la ciencia médica tiene un excelente entendimiento de la apendicitis y su tratamiento, está muy limitada en su capacidad para reconocer o diagnosticar con exactitud la enfermedad.

20 El objetivo de un diagnóstico preciso y temprano se complica por el considerable solapamiento de apendicitis verdadera con otros estados clínicos. Parece que no hay signo individual, síntoma, prueba o procedimiento que pueda proporcionar una indicación fidedigna de apendicitis. La tecnología de obtención de imágenes es inadecuada en la identificación y la caracterización del apéndice, especialmente en las fases tempranas de la enfermedad cuando es probable que el tratamiento sea más eficaz. La tecnología de obtención de imágenes es además desventajosa por sus gastos y su dependencia de la disponibilidad de personal altamente cualificado y experimentado para interpretar los estudios. Esta limitación afecta a miles de personas cada año por el diagnóstico incorrecto de su problema o por el retraso del diagnóstico exacto. En casos de apendicitis, los retrasos en el diagnóstico son el único factor más importante que conduce al empeoramiento de la afección y a más complicaciones relacionadas con la enfermedad. El diagnóstico erróneo de apendicitis puede conducir no sólo a cirugía innecesaria, sino también a retrasar la apropiada terapia para la afección subyacente real.

30 Un dilema para los cirujanos es cómo minimizar la tasa de apendicectomías negativas sin aumentar la incidencia de perforación entre pacientes que pensaban que podían tener apendicitis. Lo que se necesita urgentemente para tratar más eficazmente esta enfermedad muy común es una prueba de diagnóstico fidedigno simple que pueda reconocer las fases más tempranas del proceso de enfermedad.

35 La patogénesis típica en la apendicitis empieza con la obstrucción de la luz, aunque una inflamación inicial del órgano puede preceder e incluso contribuir a la obstrucción. La mucosidad secretada del apéndice llena la luz cerrada, produciendo un aumento en la presión intraluminal y la distensión. El aumento de la presión intraluminal puede superar el nivel de presión de perfusión capilar, produciendo la perturbación del drenaje linfático y circulatorio normal. Por último lugar, el apéndice puede volverse isquémico. La mucosa del apéndice está comprometida, que puede permitir la invasión de bacterias intralumenales. En casos avanzados, la perforación del apéndice también puede producirse con derrame de pus en la cavidad peritoneal.

40 Actualmente, el diagnóstico de apendicitis es difícil, y la dificultad persiste durante diversas fases en la progresión de la afección. Lo siguiente representa una representación hipotética de fases y presentaciones clínicas asociadas. Los expertos en la materia reconocerán que se producirá un grado de variación considerable en una población de pacientes dada.

45 En las fases más tempranas de inflamación un paciente puede presentar una variedad de signos y síntomas no específicos. Tras la obstrucción, la presentación puede implicar dolor periumbilical, ligeros calambres y pérdida del apetito. El progreso hacia el aumento de la presión luminal y la distensión puede asociarse a la presentación que implica la localización de dolor en el cuadrante inferior derecho del abdomen, náuseas, vómitos, diarrea y febrícula. Si se produce la perforación, un paciente puede presentar dolor intenso y fiebre alta. En este estado muy avanzado la sepsis puede ser un riesgo grave con un resultado posiblemente mortal.

50 Los médicos usan actualmente varias herramientas para ayudar en el diagnóstico de apendicitis. Estas herramientas incluyen examen físico, pruebas de laboratorio y otros procedimientos. Las pruebas de laboratorio rutinarias incluyen hemograma completo (CBC) con o sin diferencial y análisis de orina (UA). Otras pruebas incluyen un barrido por tomografía computarizada (CT) del abdomen y ultrasonografía abdominal. Los procedimientos pueden incluir, por ejemplo, examen laparoscópico y cirugía exploradora.

Flum y col. intentaron determinar si la frecuencia de diagnóstico erróneo que precedía a la apendicectomía

había disminuido al aumentar la disponibilidad de ciertas técnicas (Flum DR y col., 2001). Estas técnicas incluyeron tomografía computarizada (CT), ultrasonografía y laparoscopia, que se han sugerido para pacientes que presentan signos ambiguos de apendicitis. Flum y col. concluyeron del siguiente modo: “Contrario a lo esperado, la frecuencia de diagnóstico erróneo que conduce a apendicectomía innecesaria no ha cambiado con la introducción de la tomografía computarizada, la ultrasonografía y la laparoscopia, ni ha disminuido la frecuencia de perforación. Estos datos sugieren que en un nivel de población el diagnóstico de apendicitis no ha mejorado con la disponibilidad de pruebas de diagnóstico avanzadas”. La tasa de diagnóstico erróneo de apendicitis es aproximadamente el 9 por ciento en hombres y aproximadamente 23,2 por ciento en mujeres (Neary, W., 2001).

El complejo de proteína relacionada con meloide 8/14 (MRP-8/14) es un complejo heterodimérico asociado a afecciones inflamatorias agudas (para una revisión véase Striz y Trebichavsky, 2004). El complejo pertenece a la superfamilia S100 de proteínas y también está relacionado con S100A8/9, L1, la proteína relacionada con el factor inhibidor de macrófagos y calprotectina. El heterodímero consiste en una subunidad de 8 kilodalton (MRP-8) y 14 kilodalton (MRP-14). MRP-8 y MRP-14 se llaman alternativamente S100A8/calgranulina y S100A9/calgranulina b, respectivamente. MRP-8/14 es una proteína de unión a calcio descubierta originalmente en macrófagos. Los neutrófilos que expresan altas concentraciones de MRP-8/14 se encuentran en una variedad de afecciones inflamatorias que incluyen artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y rechazo de aloinjertos (Frosch y col., 2000; Limburg y col., 2000; Burkhardt y col., 2001).

El MRP-8/14 no siempre es diagnóstico de inflamación. Por ejemplo, no indica de forma fidedigna la presencia de divertículos inflamatorios (Gasché, C. 2005). Los linfocitos no contienen generalmente MRP-8/14 (Hycult Biotechnology, Monoclonal Antibody to Human S100A8/A9) y, por tanto, el MRP-8/14 no es diagnóstico de inflamación caracterizada por la presencia de linfocitos, pero no neutrófilos. Por tanto, esta proteína no siempre está asociada a infecciones oportunistas (Froland, M.F. y col., 1994).

La haptoglobina es una proteína de fase aguda que se une a hemoglobina libre tras la hemólisis. El complejo haptoglobina-hemoglobina se elimina por el hígado. La haptoglobina es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades alfa y dos beta. Las unidades alfa y beta se derivan de un único precursor de la cadena de polipéptidos que se escinde enzimáticamente para producir las subunidades. Los pesos moleculares de las subunidades son aproximadamente 9 kd-18 kd y 38 kd para alfa y beta, respectivamente.

Además de ser un eliminador de hemoglobina, la haptoglobina tiene una amplia gama de funciones biológicas (Dobryszczycka, 1997). Se ha mostrado que la haptoglobina se regula por incremento y modula la respuesta inmunitaria en ciertas afecciones de infección e inflamatorias regulando quizás la función de monocitos (Arredouani y col., 2005). Se ha demostrado que la subunidad alfa es un marcador de suero posiblemente útil para cáncer de ovario (Ye y col., 2003).

La capacidad para diagnosticar con exactitud apendicitis se aumentaría enormemente por la identificación de moléculas diferencialmente asociadas a apendicitis.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar apendicitis en un paciente del que se sospecha que tiene apendicitis que comprende probar la presencia de MRP-8/14, a un nivel diagnóstico de apendicitis, en una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenido del paciente. El procedimiento también puede comprender identificar al menos un síntoma clásico de apendicitis en dicho paciente. El procedimiento puede comprender adicionalmente identificar la presencia de al menos una molécula diferencialmente asociada a apendicitis en un fluido o muestra de tejido de dicho paciente. Se reconoce en la materia que el diagnóstico de apendicitis es difícil, y que frecuentemente se diagnostica erróneamente. Por tanto, el término “diagnosticar apendicitis” como se usa en este documento no significa necesariamente diagnosticar apendicitis con más exactitud de la usual. Sin embargo, en realidad, se ha mostrado que los procedimientos de la presente invención proporcionan mejoras en el diagnóstico correcto, con casi ningún positivo falso y pocos negativos falsos.

D1 Kumar y col., J. Leukocyte Biol. 70, 59-64 (2001) desvelan que la “activación fagocítica de neutrófilos, *in vivo*, en apendicitis aguda ..., se caracteriza por la pérdida de inmunorreactividad citoplásmica para S100A8”. Ikemoto y col., Clin Chem 49, 594-600 (2003) también desvelan un dispositivo de prueba de inmunoensayo para MRP-8/14. Sin embargo, la presencia de MRP-8/14 en sangre, plasma o suero no se desvela, y ciertamente no se sugiere en los niveles de diagnóstico para la evaluación de apendicitis en ningún documento.

Otros documentos en la materia (Maruniak y col., Fed. Proc. 46, 986 (1987); documentos EP 0428 080; US 5.055.389; Ng y Lai, Yale J. Biol. Med. 75, 41-45 (2002); y Barcia y Reissenweber, Ann. Diagn. Path. 6, 352-356 (2002)) desvelan diversos procedimientos de diagnóstico de apendicitis probando una molécula diferencialmente asociada a apendicitis, además de dispositivos y kits de prueba para tales procedimientos. Sin embargo, ninguno de estos documentos se refiere a MRP-8/14.

El término “diferencialmente asociada” con respecto a una molécula “diferencialmente asociada a

apendicitis” se refiere: (1) a una molécula presente en un paciente con apendicitis y no presente en un paciente que no tiene apendicitis; (2) a una molécula cuyo nivel relativo (cantidad) está distinguiendo entre apendicitis y no apendicitis; (3) a una molécula presente, o presente a un nivel, conjuntamente con la presencia de otros síntomas de apendicitis, que es diagnóstica de apendicitis; y/o (4) a una molécula presente, o presente a un nivel; conjuntamente con la falta de síntomas asociados a afecciones distintas de apendicitis en las que se produce la presencia de la molécula, esto es diagnóstico de apendicitis.

El nivel de diagnóstico de una molécula tal también se denomina en este documento como la “cantidad umbral” o el “nivel umbral”. Las moléculas diferencialmente asociadas a apendicitis son preferentemente antígenos de proteína.

Los síntomas clásicos de apendicitis incluyen: dolor en el abdomen; dolor que empieza cerca del ombligo, luego se mueve al cuadrante derecho inferior del abdomen; anorexia (pérdida del apetito); problemas de alimentación acompañados de somnolencia; náuseas que empiezan después de la aparición del dolor; vómitos que empiezan después de la aparición de dolor; vómitos acompañados de fatiga; estreñimiento; heces pequeñas con mucosidad; diarrea; incapacidad para eliminar los gases; febrícula; distensión abdominal; dolor en el abdomen que empeora; tenesmo (sensación de necesidad de defecar); fiebre alta; y leucocitosis. El aumento de la viscosidad del plasma también está asociado a apendicitis. En una realización de la invención se identifican al menos dos o más síntomas de apendicitis.

En una realización de la presente invención se criban pacientes para determinar si tienen o no una “afección interferente”, es decir, otra afección en la que la molécula está presente en el tipo de muestra que se prueba. Los pacientes se prueban para la presencia de la molécula si no tienen una afección interferente tal; o se prueban para la presencia de niveles de diagnóstico de apendicitis de la molécula si tienen una afección interferente tal. Los niveles de diagnóstico de apendicitis cuando el paciente tiene una afección interferente son niveles superiores a los presentes en pacientes que tienen la afección interferente, pero no tienen apendicitis. Las afecciones interferentes incluyen aloinjerto reciente; septicemia; meningitis; neumonía; tuberculosis; artritis reumatoide; cáncer gastrointestinal; enfermedad inflamatoria del intestino; cáncer de piel, periodontitis, preeclampsia y SIDA.

Una muestra puede ser un fluido o tejido, y puede contener sangre completa, plasma, suero, leche, orina, saliva y/o células. También pueden usarse muestras fecales. Las muestras de tejido y fecales se licúan preferentemente antes de la prueba.

En una realización de la presente invención se prueba al menos una molécula adicional diferencialmente asociada a apendicitis. La identificación de moléculas adicionales proporciona mayor precisión al procedimiento.

Una molécula diferencialmente asociada a apendicitis es MRP-8/14. Otra es haptoglobina. Ambas moléculas pueden probarse en el diagnóstico de apendicitis.

Los niveles de MRP-8/14 en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 11 $\mu\text{g/ml}$ están presentes en pacientes sin apendicitis. Niveles superiores a estos proporcionan un aumento de la precisión en el diagnóstico de apendicitis. Pueden usarse niveles superiores a aproximadamente 10, 11, 13, 15 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ de MRP-8/14 para diagnosticar apendicitis. Niveles de haptoglobina en el intervalo de aproximadamente 27-139 mg/dl se encuentran en pacientes sin apendicitis. Niveles superiores a estos, por ejemplo, superiores a 125, 130, 135, 139 y 150 proporcionan un aumento de la precisión en el diagnóstico de apendicitis.

Otras moléculas que pueden probarse, o que pueden probarse además de las moléculas anteriores, incluyen proteínas estructurales únicas del tracto gastrointestinal, mediadores inflamatorios relacionados con el estrés, factores inmunológicos, indicadores de flora bacteriana intestinal, inhibidor 1 del activador de plasminógeno, proteínas de unión a ácidos grasos, factor kappa beta nuclear (NF κ B), antígenos de apéndice específicos (HLA-DR), antígenos asociados a inflamación; y ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores que incluyen ácidos nucleicos que codifican MRP-8/14 y haptoglobina. Los procedimientos para probar la presencia de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica.

Los procedimientos que implican obtener una primera muestra de un paciente del que se sospecha que tiene apendicitis también pueden comprender identificar al menos una molécula diferencialmente asociada a apendicitis mediante un procedimiento que incluye obtener un segundo fluido o muestra de tejido de un segundo paciente, en el que el segundo paciente tiene apendicitis; obtener un tercer fluido o muestra de tejido de un tercer paciente en el que el tercer paciente tiene una afección de no apendicitis caracterizada por al menos un síntoma de apendicitis; y analizar la segunda y tercera muestras de manera que se detecte una molécula diferencialmente asociada a la apendicitis en el segundo paciente, y luego identificar la presencia de esa molécula, o la presencia de un aumento del nivel de esa molécula, en la primera muestra, diagnosticándose así la apendicitis. Las moléculas candidatas para este procedimiento de identificación de moléculas diferencialmente asociadas a apendicitis incluyen proteínas estructurales únicas del tracto gastrointestinal, mediadores inflamatorios relacionados con el estrés, factores inmunológicos, indicadores de flora bacteriana intestinal, inhibidor 1 del activador de plasminógeno,

proteínas de unión a ácidos grasos, factor kappa beta nuclear (NFκB), antígenos de apéndice específicos (HLA-DR), antígenos asociados a inflamación y ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores.

5 También se desvela un procedimiento para identificar una molécula diferencialmente asociada a apendicitis, comprendiendo el procedimiento obtener una muestra de cada uno de una pluralidad de pacientes que se sometieron a cirugía porque se pensaba que podían tener apendicitis; determinar durante la cirugía si cada dicho paciente tiene apendicitis o no; y analizar dichas muestras para la presencia de una molécula diferencialmente asociada a apendicitis. Las muestras pueden ser muestras de sangre o muestras de tejido de apéndice. Este procedimiento también puede incluir determinar la cantidad de cada molécula que se encuentra que está diferencialmente asociada a apendicitis en la muestra. En una realización de la invención, tras la identificación de la molécula en tejido, también se identifica en plasma. Esto requiere que se tomen muestras de sangre de pacientes de los que se sospecha que tienen apendicitis. También se determina la cantidad de la molécula diferencialmente asociada a apendicitis en pacientes que tienen apendicitis en comparación con aquellos que no tienen.

15 Los procedimientos para diagnosticar apendicitis pueden incluir usar dispositivos de prueba, por ejemplo, dispositivos de prueba en cartucho y dispositivos de prueba de tiras reactivas, y/u otros medios para determinar la presencia o ausencia de una molécula diferencialmente asociada a apendicitis, por ejemplo, realizando transferencias Western, transferencias Northern, pruebas de ELISA, pruebas de la función de proteínas, PCR y otros ensayos conocidos en la técnica. En la prueba de moléculas diferencialmente asociadas a apendicitis que están presentes en pacientes sin apendicitis, pero reguladas por incremento en pacientes con apendicitis, se requieren ensayos que prueben la cantidad relativa de la molécula presente en fluidos o tejidos de pacientes, además de la mera presencia de la molécula. Pueden diseñarse inmunoensayos en cartucho para proporcionar información sobre cantidades relativas de tales moléculas como se describen en este documento. Pueden usarse otros ensayos conocidos en la técnica que incluyen ELISA y dispositivos de ensayo en hospital tales como el sistema Synchron LX de Beckman Coulter para proporcionar la cantidad de tales moléculas presentes en el paciente, que luego pueden compararse con cantidades presentes en pacientes sin apendicitis para determinar si el paciente tiene o no apendicitis.

25 Los procedimientos para diagnosticar apendicitis pueden incluir realizar un ensayo inmunológico usando un anticuerpo monoclonal o policlonal para la molécula diferencialmente asociada a apendicitis. Tales anticuerpos son conocidos en la técnica o pueden generarse por medios conocidos en la técnica sin experimentación adicional.

30 También se desvela un dispositivo de prueba de inmunoensayo para detectar la presencia de una molécula diferencialmente asociada a apendicitis en una muestra. El dispositivo comprende un primer anticuerpo monoclonal o policlonal específico para la molécula, un soporte para el primer anticuerpo monoclonal o policlonal, medios para poner en contacto el primer anticuerpo monoclonal o policlonal con la muestra y un indicador que puede detectar la unión del primer anticuerpo monoclonal o policlonal a la molécula.

35 La detección de la unión del anticuerpo a la molécula puede incluir unir el complejo anticuerpo/molécula a un segundo anticuerpo marcado que se une a la molécula o al anticuerpo del complejo.

40 Los dispositivos de prueba pueden estar en forma de cartuchos, tiras reactivas u otras conformaciones conocidas en la técnica. El dispositivo de prueba también puede ser parte de un kit que puede contener instrucciones para uso, instrucciones para la comparación de los resultados de prueba con resultados de la misma prueba hecha en un paciente sin apendicitis, reactivos adicionales tales como células o fluidos de pacientes sin apendicitis, y otros reactivos conocidos en la técnica. Estos tipos de dispositivos de ensayo son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. nº 2003/0224452.

45 Los procedimientos para diagnosticar apendicitis pueden incluir comparar el nivel de la molécula en la muestra con un nivel de fondo de la misma molécula en personas que no tienen apendicitis. Esta comparación puede hacerse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Puede incluir comparar resultados de muestras con resultados de una segunda muestra tomada de una persona que no tiene apendicitis, o comparar resultados de muestra con una fotografía u otra representación de resultados de una persona que no tiene apendicitis. También pueden usarse dispositivos de prueba que tienen medios para enmascarar niveles de no apendicitis, por ejemplo, un soporte que tiene el mismo color o tono que los indicadores que muestran niveles de no apendicitis, o un filtro que tiene el mismo color o tono que un nivel de no apendicitis, de manera que sólo los mayores niveles que indican apendicitis de la molécula son detectables, por ejemplo, a ojo. Los procedimientos pueden incluir el uso de fluidos de control que tienen niveles de fondo de la molécula típicos de muestras de no apendicitis, además de soportes coloreados y/o filtros de luz como se ha tratado anteriormente.

50 Si la muestra es sangre, el procedimiento también puede incluir el procesamiento de la sangre por un medio conocido en la técnica tal como filtración o centrifugación para separar plasma o suero que va a ensayarse.

55 Los soportes de anticuerpos son conocidos en la técnica. Los soportes de anticuerpos pueden ser almohadillas absorbentes a las que los anticuerpos se unen en forma de quita y pon o de forma fija. En los dispositivos desvelados puede usarse cualquier medio indicador conocido en la técnica para detectar la unión del

anticuerpo a la molécula. Los medios indicadores pueden incluir segundos anticuerpos monoclonales o policlonales marcados que se unen a la proteína seleccionada que preferentemente se unen a un epítipo sustancialmente diferente sobre la proteína seleccionada de aquellos a los que se unen los primeros anticuerpos monoclonales o policlonales tal que la unión del primer anticuerpo monoclonal o policlonal no bloquee la unión del segundo anticuerpo, o viceversa. Los medios indicadores también pueden incluir una ventana de prueba por la que pueden visualizarse anticuerpos marcados. Puede usarse cualquier marca conocida en la técnica para marcar el segundo anticuerpo. La marca puede ser oro coloidal. El segundo anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El primer anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal hecho usando una secuencia de polipéptidos específica de la molécula diferencialmente asociada a apendicitis, y el segundo anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal diferente que se une a un sitio diferente de la molécula o se une al primer anticuerpo. Los anticuerpos para MRP-8 y MRP-14 están comercialmente disponibles de Cell Sciences, Canton, MA. Los anticuerpos monoclonales para haptoglobina útiles en los procedimientos de la presente invención también son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.552.295.

La muestra que va a ensayarse puede ser un líquido, y el dispositivo de prueba de inmunoensayo puede ser un dispositivo de flujo lateral que comprende medios de entrada para el flujo de una muestra de líquido en contacto con los anticuerpos. El dispositivo de prueba también puede incluir un medio de control de flujo para asegurar que la prueba esté funcionando adecuadamente. Tales medios de control de flujo pueden incluir antígenos de control unidos a un soporte que capturan anticuerpos de detección como medio de confirmación del flujo apropiado del fluido de muestra por el dispositivo de prueba. Alternativamente, los medios de control de flujo pueden incluir anticuerpos de captura en la región de control que capturan los anticuerpos de detección, indicando de nuevo que está teniendo lugar el flujo apropiado dentro del dispositivo.

También se desvelan procedimientos para detectar la presencia de una molécula diferencialmente asociada a apendicitis usando los dispositivos anteriores, comprendiendo los procedimientos: proporcionar un dispositivo de prueba de inmunoensayo de la presente invención; poner en contacto un primer anticuerpo con una muestra; y leer un indicador que puede detectar la unión del primer anticuerpo. Preferentemente, la unión indica apendicitis en el paciente que está probándose. Los procedimientos de uso de estos dispositivos pueden realizarse en el consultorio médico, sala de urgencias o consultorio, en vez de requerir el envío del paciente o la muestra a un laboratorio separado.

Los dispositivos desvelados son útiles para probar las muestras anteriormente mencionadas. Si se prueban las células, por ejemplo, cuando la molécula diferencialmente asociada a apendicitis se sospecha que está en células de sangre o de tejido en vez de en suero, el procedimiento y/o dispositivo puede incluir una etapa de lisado de células o medios usando detergente, punción u otro procedimiento físico o químico conocido en la técnica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Imagen de electroforesis bidimensional de proteínas de (A) tejido de apéndice normal y (B) enfermo. Las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico en el eje x y por peso molecular en el eje y. El peso molecular en kilodalton se muestra a la izquierda. La flecha indica la proteína regulada por incremento, AP-93.

Figura 2: Análisis de transferencia Western de MRP-14 de tejido normal (N) y enfermo (A). Los números son números de ID de muestras. Los pesos moleculares se muestran en kilodalton.

Figura 3: Análisis de transferencia Western de MRP-8 de tejido normal (N) y enfermo (A). Los números son números de ID de muestras. Los pesos moleculares se muestran en kilodalton.

Figura 4: Niveles relativos de MRP-8/14 en suero normal y de apendicitis como se determina por ELISA. Los niveles se facilitan como una fracción de la media para los pacientes que no tienen apendicitis, denominándose también dicha fracción en este documento "número de veces del aumento". Las barras oscuras representan muestras de pacientes que tienen apendicitis. Las barras blancas representan muestras de pacientes que no tienen apendicitis.

Figura 5: Imágenes de electroforesis bidimensional de proteínas en muestras de suero empobrecido de pacientes (A) normales y (B) con apendicitis. Las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico en los ejes x y y por peso molecular en los ejes y. El peso molecular en kilodalton se muestra a la derecha. La flecha de cola larga indica la proteína regulada por incremento, AP-77 (subunidad de haptoglobina alfa). La flecha sin cola indica una proteína de control que es igualmente de abundante en enfermo frente a normal.

Figura 6: Imágenes de electroforesis bidimensional de proteínas de tejido de apéndice (A) normal y (B) enfermo (perforado). Las proteínas se separaron por enfoque isoeléctrico en el eje x y por peso molecular en el eje y. El peso molecular en kilodalton se muestra a la izquierda. La flecha indica la proteína regulada por incremento, AP-91 (subunidad de haptoglobina alfa).

Figura 7: Distribución de haptoglobina. Análisis de transferencia Western de haptoglobina de tejido normal

(N) y enfermo (A). Los números son número de ID de muestra. Los pesos moleculares se muestran en kilodalton. Las subunidades alfa y beta son >20 kd y 38 kd, respectivamente.

Descripción detallada

5 El apéndice vermiforme es reconocido como un órgano separado de los intestinos grueso y delgado. Se extiende como una bolsa similar a un dedo desde la base del colon ascendente, que también se llama el ciego. El apéndice, al igual que el intestino grueso, está hueco y compuesto por las tres mismas capas de tejido. Estas tres capas son una mucosa, una muscular y una serosa. La luz apendicular comunica con la luz del ciego mediante una abertura abierta (orificio) por la que el apéndice añade sus secreciones a la corriente fecal. Estas secreciones son mucosidad en exceso producidas por la mucosa apendicular. Además de contener mucosidad, el apéndice también
10 contiene numerosas bacterias comunes al colon derecho. La obstrucción de la luz apendicular es el factor dominante que causa apendicitis aguda. Aunque los fecalitos son la causa usual de la obstrucción apendicular, tejido linfóide hipertrofiado, bario espesado a partir de estudios de rayos X, semillas de hortalizas y frutas, y gusanos intestinales como ascáridos también pueden bloquear la luz apendicular.

15 Tras la obstrucción luminal sigue un ciclo de escalada de acontecimientos. La obstrucción proximal del apéndice produce una obstrucción de bucle cerrado que bloquea el flujo normal de mucosidad apendicular en el ciego. La secreción normal continuada de la mucosidad apendicular llena muy rápidamente la capacidad luminal del apéndice (aproximadamente 0,1 cc). Una vez la capacidad luminal del apéndice ha alcanzado la producción de mucosidad adicional el apéndice obstruido eleva rápidamente la presión intraluminal dentro del órgano. Esta elevada presión intraluminal es ejercida hacia fuera contra la pared apendicular y hace que el apéndice se distense. La distensión estimula terminaciones nerviosas de las fibras de dolor del aferente visceral, produciendo dolor difuso sordo vago en el abdomen medio o epigastrio inferior. El peristaltismo también se estimula por la distensión bastante súbita, de manera que algunos calambres pueden superponerse al dolor visceral pronto en el transcurso de la apendicitis.

25 La distensión del apéndice continúa, no sólo por la secreción de mucosa continuada, sino también por la rápida multiplicación de las bacterias residentes del apéndice. Como aumenta la presión en el organismo, se supera la presión venosa dentro de la pared apendicular. Esta presión intraluminal creciente ocluye entonces los capilares y vénulas, pero el flujo arteriolar continúa, produciendo ingurgitación y congestión vascular. La distensión de esta magnitud normalmente produce náuseas reflejas y vómitos, y el dolor visceral difuso se vuelve más intenso. El proceso inflamatorio pronto implica a la serosa del apéndice y a su vez al peritoneo parietal en la región, produciendo el desplazamiento característico en el dolor hacia el cuadrante inferior derecho (CID). El proceso de enfermedad está bastante avanzado cuando el dolor se localiza en el CID.

30 La mucosa del tracto gastrointestinal, que incluye el apéndice, es muy susceptible al riesgo sanguíneo alterado. Por tanto, la integridad de la mucosa se compromete pronto en el procedimiento, permitiendo la invasión bacteriana en las capas de tejido más profundas. Esta invasión bacteriana conduce a destrucción apendicular y a liberación sistémica de diversas toxinas bacterianas. Se desarrolla fiebre, taquicardia y leucocitosis como consecuencia de esta liberación sistémica de productos de tejidos muertos y toxinas bacterianas. A medida que aumenta la distensión apendicular progresiva, aumentando la presión arteriolar, se desarrollan infartos elipsoidales en el borde antimesentérico de la serosa apendicular. A medida que avanzan la distensión, la invasión bacteriana, el equilibrio del aporte vascular y el infarto, la perforación se produce por una de las áreas de infarto en el borde antimesentérico. Entonces, esta perforación libera las bacterias y sus toxinas en la cavidad abdominal.

35 La apendicitis se ha llamado el "gran imitador" ya que sus síntomas son frecuentemente confundidos con los de otras afecciones. Esta confusión proviene de la naturaleza no específica del dolor temprano en su transcurso y la variabilidad en cómo progresa la apendicitis. El dolor en el cuadrante inferior derecho del abdomen es el distintivo de apendicitis, pero no es normalmente lo primero que percibe el paciente. Cuando primero se obstruye la luz apendicular, el paciente tendrá pocos síntomas, si tiene alguno, debido a que la luz apendicular todavía no ha tenido la oportunidad de llenarse de la mucosidad. El tiempo requerido para llenar la luz apendicular es proporcional al volumen de la luz disponible detrás de la obstrucción. Esto es variable e impredecible ya que el volumen depende del tamaño individual del apéndice y exactamente de dónde se localice el fecalito u otra obstrucción a lo largo de esa longitud. Si el fecalito u otra obstrucción están próximos a la punta del apéndice, el volumen disponible es
45 relativamente pequeño y el tiempo para los síntomas o la perforación es corto. A diferencia, si lo opuesto es verdad, el fecalito u otra obstrucción están próximos a la base del apéndice y proporcionan el mayor volumen apendicular posible.

50 Una vez que el apéndice empieza a distenderse, el paciente con apendicitis empezará a experimentar una molestia no específica normalmente en la porción media del abdomen. Esta molestia puede confundirse fácilmente con enfermedades comunes tales como indigestión, estreñimiento o una enfermedad vírica. La distensión apendicular continuada también va acompañada de algunas náuseas y frecuentemente vómitos. Raramente son los vómitos intensos o constantes, que refuerza la confusión con enfermedades comunes.

Más tarde en la progresión de la apendicitis, la inflamación habrá progresado a la capa más externa del apéndice. Esta capa más externa se llama la serosa y toca el revestimiento interno de la cavidad abdominal llamada el peritoneo. Este contacto irrita el peritoneo, produciendo peritonitis que es percibida por el paciente con apendicitis como dolor focal en cualquier parte en la que el apéndice esté tocando el peritoneo. Esto también puede variar entre diferentes individuos. El apéndice está normalmente la mayoría de las veces localizado en el cuadrante inferior derecho bajo un área conocida como el punto de McBurney. El punto de McBurney es una posición sobre el abdomen que es aproximadamente dos tercios de la distancia desde la espina iliaca superior anterior en una línea recta hacia el ombligo. Sin embargo, el apéndice puede residir en otras localizaciones en cuyo caso la peritonitis producida por el apéndice será en una localización atípica. Esto es de nuevo un factor común que produce un diagnóstico erróneo y retrasa el tratamiento quirúrgico en casos de apendicitis.

Independientemente de su localización, si se deja que la apendicitis progrese, el órgano se perforará eventualmente. Esto contamina la cavidad abdominal alrededor del apéndice perforado con bacterias que producen una infección grave. Esta infección conducirá normalmente a un absceso intra-abdominal localizado o gangrena y puede producir sepsis generalizada.

Para identificar moléculas diferencialmente asociadas a apendicitis se usó un enfoque proteómico. Se identificó un complejo de proteína, MRP-8/14, que está presente en tejido de apéndice en pacientes con apendicitis aguda. La naturaleza altamente correlativa de este complejo con la apendicitis llevó a que los inventores examinaran niveles de MRP-8/14 en suero en pacientes con apendicitis aparente. El MRP-8/14 es significativamente elevado ($p < 0,02$) en pacientes con apendicitis con respecto a niveles en pacientes con apendicitis aparente que todavía no tienen inflamación apendicular. La fuente de MRP-8/14 en el suero es el tejido inflamado del apéndice. Esto está de acuerdo con las funciones conocidas de MRP-8/14.

La función del MRP-8/14 en la inflamación no se entiende completamente, pero parece que desempeña una función vital en la retención de leucocitos en microcapilares. El MRP-8/14 extracelular interactúa con células endoteliales uniéndose a sulfato de heparina y glicanos específicamente carboxilados (Robinson y col., 2002). Las rutas de señalización intracelular y los mecanismos efectores inducidos por la unión de MRP-8/14 a células endoteliales no están bien definidos. Sin embargo, la interacción de MRP-8/14 con fagocitos aumenta la actividad de unión del receptor de integrina CD11b-CD18. Esta es una de las rutas de adhesión más importantes de leucocitos a endotelio vascular (Ryckman y col., 2003). Se cree que el MRP-8/14 utiliza el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Un familiar de MRP-8/14, S100A12, es un ligando específico de RAGE expresado por células endoteliales y su interacción activa la unión de NF-kappa B en estas células (Hsieh y col., 2004). La unión de NF-kappa B induce posteriormente expresión de muchas moléculas proinflamatorias tales como diversas citocinas o moléculas de adhesión. Por tanto, la liberación y las funciones extracelulares de las proteínas S100 representan un mecanismo de retroalimentación positivo por el que los fagocitos promocionan adicionalmente el reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación. Considerados en conjunto parece que estas proteínas desempeñan una función en una respuesta inflamatoria fundamental en ciertas afecciones inflamatorias, y son marcadores excelentes de inflamación de tejido de apéndice.

Los neutrófilos son glóbulos blancos que son los primeros en migrar de la circulación a sitios de inflamación. Dentro de los neutrófilos, que constituyen aproximadamente el 40% de las proteínas citosólicas totales, está el complejo MRP-8/14. Esta proteína sólo se expresa específicamente en células de linaje macrófago, haciendo que los monocitos de la sangre y los macrófagos agudamente activados sean otras posibles fuentes de glóbulos blancos de estas proteínas. El MRP-8/14 no se expresa normalmente en linfocitos no macrófagos residentes o aquellos macrófagos que participan en inflamación crónica. Estas dos proteínas también se conocen por expresarse independientemente por epitelio de la mucosa en estados específicos de inflamación aguda.

En el caso de apendicitis, la obstrucción luminal y la distensión resultante de la pared apendicular desencadena una respuesta inflamatoria. Entonces, los neutrófilos en circulación son reclutados al área, ya que son macrófagos activados. Aunque la expresión de este complejo de proteínas está relacionada con la actividad de los macrófagos en inflamación, no se conoce completamente la exacta relación entre MRP-8/14 y la actividad celular. Lo que se sabe es que la distribución intracelular de MRP-8/14 varía con el estado de activación de los macrófagos. Los macrófagos normales contienen los complejos en el citosol, pero una vez estimulados el MRP-8/14 se transloca del citosol a la membrana celular (específicamente con las proteínas del citoesqueleto). Esto implicaría que el MRP-8/14 puede relacionarse con el movimiento de células, la fagocitosis o la transducción de señales inflamatorias. Las funciones del movimiento celular y la transducción de señales también pueden explicar por qué el MRP-8/14 se produce directamente a partir de epitelio vascular tal como el que reviste los vasos sanguíneos dentro del apéndice.

Independientemente de su función en ciertas afecciones inflamatorias, la abundancia de MRP-8/14 dentro de células de inflamación aguda hace que sea un detector y monitor excelente de apendicitis aguda. La primera etapa en el proceso inflamatorio es el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a un sitio específico. En el estudio de los inventores, el sitio específico es el apéndice, en el que aquellas células que contienen MRP-8/14 captarán el estímulo causal. Esta captación producirá normalmente la muerte de células de MRP-8/14 y la liberación de MRP-8/14 de tanto el citosol como de la membrana celular en la circulación del paciente. Al mismo tiempo, los

revestimientos de la mucosa del apéndice empezarán a producir y liberar MRP-8/14 para facilitar la migración de macrófagos o la amplificación inflamatoria. Entonces, este proceso se intensificará a medida que aumentan las cantidades de células de MRP-8/14 que son reclutadas por la apendicitis para liberar por último lugar más MRP-8/14 a la circulación. Se conocen otros ejemplos de estados inflamatorios que producen el aumento de MRP-8/14 extracelular y la tendencia de estos aumentos de MRP-8/14 para establecer una correlación con el grado de inflamación. Específicamente, la bronquitis crónica, la fibrosis quística y la artritis reumatoide están todos asociados a niveles elevados de MRP-8/14 en suero y la gravedad de estas enfermedades es generalmente proporcional a los niveles detectados de MRP-8/14 en suero.

La función fisiológica de MRP-8/14 hace que sea un marcador clínico ideal para apendicitis aguda. Como los pacientes con apendicitis son generalmente jóvenes y están sanos, generalmente se produce una respuesta inflamatoria vigorosa. Se cree que esta respuesta vigorosa libera MRP-8/14 en las fases más tempranas de la enfermedad, que entonces se intensifica a medida que progresa la apendicitis. Adicionalmente, las enfermedades conocidas por asociarse a niveles elevados de MRP-8/14 no son comunes en este grupo de edad más joven y normalmente no producen sintomatología similar a apendicitis. Finalmente, como el MRP-8/14 no está localizado en ni asociado a la proliferación de linfocitos, no se cree que este marcador sea elevado en infecciones víricas. Esto es una ventaja especialmente poderosa para diagnosticar apendicitis, ya que las infecciones víricas son uno de los imitadores más comunes de la apendicitis.

La haptoglobina también se identificó en este documento como un marcador útil para la apendicitis. Un cribado proteómico diferencial de suero empobrecido identificó la haptoglobina como un marcador para la apendicitis. Un segundo cribado diferencial de tejido del apéndice confirmó que la haptoglobina estaba regulada por incremento en el tejido de apéndice de pacientes con apendicitis. Este hallazgo se confirmó por transferencia Western de proteína de tejido. En particular, las isoformas de la subunidad alfa sólo estaban presentes en tejido enfermo. Como la haptoglobina es una proteína plasmática, es altamente valiosa como biomarcador para apendicitis.

Ejemplos

Ejemplo 1. MRP-8/14

El objetivo de este estudio fue identificar un marcador específico para tejido que pudiera contribuir a la matriz de decisión para diagnosticar apendicitis aguda temprana. Se usó un cribado proteómico para identificar una proteína en el apéndice específicamente regulada por incremento en apendicitis aguda. El MRP-8/14 se identificó como presente tanto en el apéndice enfermo como en suero de pacientes con apendicitis aguda.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Recogida de especímenes y de suero. Todos los pacientes enrolados en este estudio se trataron según normas de cuidado aceptadas como se definen por sus médicos prácticos. Antes de abordarse la inclusión en el estudio de los inventores, todos los pacientes fueron evaluados por un cirujano y fueron diagnosticados como que tenían apendicitis. Los planes del cirujano práctico para estos pacientes con apendicitis incluyeron una apendicectomía inmediata. Los detalles de todos los tratamientos tales como el uso de antibióticos, técnica quirúrgica (tanto abierta como laparoscópica), fueron determinados por el propio cirujano.

Criterios de exclusión: Cualquier paciente con enfermedades inflamatorias crónicas preexistentes tales como asma, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis o neutropenia. El embarazo también se consideró un criterio de exclusión.

Un investigador asesoró a todos los pacientes sobre el estudio y se obtuvo el consentimiento informado. En el momento del consentimiento informado al sujeto se le asignó un número de identificación y se obtuvo información demográfica y clínica no personal (edad, sexo, raza, duración de síntomas, número de glóbulos blancos (WBC), resultados de estudios de obtención de imágenes, etc.). En el momento de la cirugía, tras la inducción de anestesia general, se obtuvo una muestra de sangre completa (5-10 cc de volumen) mediante venopunción periférica. Entonces, este espécimen de sangre se colocó sobre hielo. Tan pronto como fue posible se tomó una pequeña muestra (aproximadamente 1 gramo) de apéndice inflamada del espécimen patológico y también se colocó sobre hielo. Entonces, los especímenes de sangre helados se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y se aisló el suero separado. Entonces, este suero aislado y el trozo de tejido de apéndice se almacenaron por separado, congelados a -80°C.

Procesamiento del tejido de apendicitis. El tejido de apéndice de pacientes con apendicectomía se recogió y se guardó a -80°C hasta el procesamiento. Las muestras de tejido individuales se molieron en polvo usando un mortero y pistilo estériles bajo nitrógeno líquido. Se extrajo la proteína del tejido en polvo incubando a 37°C en tampón de extracción (Tris-base 0,025 M, cloruro sódico 200 mM, EDTA 5 mM, azida sódica al 0,1%, pH 7,5). Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14K rpm. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

Análisis en gel 2D de muestras de tejido extraídas. El análisis en gel 2D se realizó en muestras de suero empobrecido y se extrajeron muestras de tejido. Se realizaron el enfoque isoelectrico (IEF) y la SDS-PAGE según el protocolo de Zoom (Invitrogen) durante el análisis en gel 2D. Se analizaron cantidades iguales de proteína sobre cada gel.

5 Se hicieron comparaciones entre gel de suero negativo y gel de suero positivo para determinar qué proteínas estaban presentes en muestras positivas y ausentes en muestras negativas. Se identificaron puntos de gel candidatos y se sometieron a análisis de identificación de proteínas por MALDI-TOF (Linden Biosciences).

10 Análisis de transferencia Western de muestras de tejido de apéndice extraída. Las muestras (10 µg) se sometieron a SDS-PAGE con Laemmli patrón y las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa para los análisis de transferencia Western usando técnicas convencionales con detección quimioluminiscente. Se usó Magic Mark Western Standard (Invitrogen) para determinar el peso molecular. Se usó MRP-8 (calgranulina A C-19, Santa Cruz, SC-8112) en una dilución 1:100 en 0,5x Uniblock (AspenBio, Inc) para el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario fue anticuerpo dirigido contra IgG de cabra conjugada con peroxidasa (H+L) purificado por afinidad (Vector, PI-9500) en una dilución 1:2000 en Uniblock. Se usó MR-14 (calgranulina B C-19, Santa Cruz, SC-8114) en una dilución 1:100 en 0,5x Uniblock para el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario fue anticuerpo dirigido contra IgG de cabra conjugada con peroxidasa (H+L) purificado por afinidad (Vector, PI-9500) en una dilución 1:2000 en Uniblock.

Determinaciones de MRP-8/14 en suero. Los niveles de MRP-8/14 en suero se determinaron por ELISA usando un ELISA comercialmente disponible (Buhlmann S100-Cellion S100 A8/A9) según el protocolo del fabricante.

20 RESULTADOS

Identificación de proteínas presentes en tejido de apéndice de pacientes con apendicitis. Se realizó un análisis proteómico diferencial en muestras de suero empobrecido con el objetivo de la identificación de proteínas elevadas en pacientes con apendicitis aguda. El análisis implicó comparar muestras de pacientes normales frente a pacientes con apéndices perforadas. Se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente antes de la cirugía. Un paciente normal en este estudio es uno que presentó dolor abdominal, se sometió a cirugía y se encontró que tenía un apéndice normal. Durante la cirugía se recogió tejido de apéndice normal y enfermo.

30 El enfoque proteómico fue comparar un conjunto de 4 muestras normales con un conjunto de 4 muestras con apendicitis usando electroforesis bidimensional. La Figura 1 muestra el perfil 2D de las proteínas analizadas. Se realizó la comparación entre los geles y la diferencia más obvia se indica en la Figura 1B como AP- 93. Basándose en el gel en la Figura 1, el peso molecular de AP-93 es aproximadamente 14 kilodalton. La rebanada de gel correspondiente se analizó por MALDI-TOF y se hizo una identificación positiva. La identificación se basó en espectros de dos péptidos trípticos, NIETIINTFHQYSVK [SEC ID N°:1] y LGHPDTLNQGEFKELVR [SEC ID N°:2]. Los péptidos se corresponden con los residuos subrayados en la siguiente secuencia de aminoácidos de MRP-14 (número de acceso de GenBank P06702):

35 MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLK
KENKNEKVEIHIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEGDEGPGHHH KPGLGEGTP [SEC ID N°:3].

La identificación por MALDI-TOF de AP-93 como MRP-14 se confirmó por la compatibilización de pesos moleculares. Basándose en estos datos, la proteína MRP-14 fue más altamente abundante en el conjunto de muestras enfermas que en el conjunto de muestras normales.

40 Presencia de MRP-14 y MRP-8 en tejido de apéndice enfermo. Con el fin de confirmar la presencia de MRP-14 en tejido enfermo se usó un anticuerpo dirigido contra MRP-14 en transferencia Western de extractos de tejido de apéndices normales y enfermos individuales. La Figura 2 muestra los datos de transferencia Western de 9 muestras normales y 11 con apendicitis. Está presente una banda de 14 kilodalton en cada muestra de apendicitis. No hay señal detectable en las muestras normales. Estos datos confirman los datos de cribado proteómico y muestran que la proteína es un indicador de tejido de apéndice enfermo.

45 Como se sabe que MRP-8 existe como un dímero con MRP-14, los especímenes de tejido también se examinaron para la presencia de MRP-8. La Figura 3 muestra los datos de transferencia Western usando un anticuerpo dirigido contra MRP-8 en las muestras de tejido normal y enfermo. Como es de esperar, la MRP-8 está presente en todas las muestras de apéndice enfermo y no es detectable en el tejido de apéndice normal. Estos datos de transferencia Western muestran que las proteínas MRP-8 y MRP-14 son notablemente más abundantes en tejido de apéndice con apendicitis que en normal.

55 Pacientes con elevados niveles de MRP-8/14 en suero con apendicitis aguda. La alta correlación entre apendicitis y la presencia de MRP-8/14 en el apéndice llevó a los inventores a examinar los niveles de MRP-8/14 en suero de aquellos pacientes y de otros pacientes posteriormente añadidos al estudio. Los sueros se recogieron antes de la cirugía, se guardaron en el banco y se analizaron después de conocerse el estado de enfermedad. Los niveles de

MRP-8/14 se midieron usando un ELISA de sándwich específico para el complejo.

5 La Tabla 1 enumera niveles de MRP-8/14 en suero para 39 pacientes como se ha determinado por un ELISA fabricado por Hycult (Los Países Bajos) y disponible comercialmente por Cell Sciences, Canton, MA. Las cantidades se facilitan como fracciones en comparación con un nivel promedio para pacientes en el estudio sin apendicitis. Obsérvese que todos los pacientes con apendicitis muestran un aumento en número de veces de MRP-8/14 con respecto a los niveles normales promedio. El procedimiento se realizó según las instrucciones adjuntas al producto de ELISA. Los números de muestras no se corresponden con los números de muestras mostrados en las Figuras 2 y 3 ya que las muestras se reenumeraron.

TABLA 1

Número de muestra	Diagnóstico clínico	Patología	Clasificación	Fracción de normal
1	Apendicitis avanzada	Apendicitis aguda leve	2	2,80428
2	Apendicitis normal	Normal	1	0,960805
3	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal	3	5,554904
4	Apendicitis perforada	Necrosis por apendicitis perforada	4	6,53913
5	Apendicitis temprana	Apendicitis aguda leve	2	4,562059
6	Apendicitis temprana	Apendicitis aguda leve	1	2,881124
7	Perforada horrible	Necrosis por apendicitis perforada	4	7,906886
8	Apendicitis normal	Apendicitis aguda leve	2	3,971489
9	Apendicitis temprana	Apendicitis transparietal	3	3,83328
10	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal	3	3,566665
11	Apendicitis	Apendicitis aguda leve	2	3,205335
12	Apendicitis	Apendicitis transparietal	3	5,51224
13	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal	3	2,92671
14	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal con necrosis	4	3,866306
15	PERFORADA	Apendicitis transparietal	3	4,54657
16	Apendicitis avanzada	Apendicitis perforada	4	7,01877
17	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal	3	4,25998
18	Apendicitis	Apendicitis transparietal	3	6,90312
19	Apendicitis normal	Normal	1	0,838679
20	Apendicitis normal	Normal	1	0,590095

(cont.)

Número de muestra	Diagnóstico clínico	Patología	Clasificación	Fracción de normal
21	Apendicitis temprana	Apendicitis con cambiadores de apendicitis	3	1,682291
22	Apendicitis normal	Normal	1	1,128849
23	Apendicitis avanzada	Apendicitis transparietal	4	2,338583
24	Apendicitis normal	Normal	1	2,478035
25	Apendicitis caliente			2,807046
26	Perforada	Perforada	4	4,954136
27	Normal	Normal	1	0,918438
28	Caliente	Caliente	2	4,387589
29	Temprana	Apendicitis transparietal	3	4,015013
30	Caliente	Apendicitis transparietal	3	2,460902
31	Normal	Normal	1	0,594943
32	Caliente	Apendicitis transparietal	3	4,211086
33	Perforada	Apendicitis transparietal	4	3,835219
34	Normal	Normal	1	1,968859
35	Perforada	Apendicitis transparietal	4	4,126198
36	Avanzada	Apendicitis transparietal	3	2,423726
37	Apendicitis caliente	Apendicitis transparietal	3	4,178647
38	Temprana	Apendicitis transparietal	3	9,584398
39	Normal	Apendicitis transparietal	2	2,835339

5 Los inventores han identificado un complejo de proteína que está presente en el apéndice y el suero de pacientes con apendicitis. Basándose en los datos de transferencia Western, la presencia de MRP-8/14 en tejido de apéndice guarda una gran relación con la enfermedad. Además, los niveles de MRP-8/14 en suero son valores predictivos de apendicitis. Los inventores suponen que este aumento es debido al aumento de la producción de estas proteínas a partir de la infiltración de neutrófilos sistémicos del apéndice y posiblemente dirigen la producción de mucosa de las proteínas por el propio apéndice. Este estudio demuestra que el MRP-8/14 es un marcador clínico útil para apendicitis aguda. Después del descubrimiento de los inventores de que el MRP-8/14 era una molécula diferencialmente asociada a apendicitis, el trabajo de los inventores se confirmó por el hallazgo de Power, C. y col., 10 2004 y 2005, que informó de la detección de esta molécula en heces de pacientes que tenían apendicitis aguda.

Ejemplo 2. Haptoglobina

15 Usando un cribado proteómico de suero y tejido de apéndice los inventores determinaron que la haptoglobina está regulada por incremento en pacientes con apendicitis aguda. La subunidad alfa de la haptoglobina es un marcador especialmente útil en el cribado de la enfermedad.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

20 La recogida de especímenes y suero, el procesamiento de tejido con apendicitis, los análisis de gel 2D de muestras de tejido extraídas y los análisis de transferencia Western de muestras de tejido de apéndices extraídas fueron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, excepto que para la transferencia Western se usó anticuerpo humano dirigido contra haptoglobina purificado por afinidad (Rockland, 600-401-272) a una dilución

1:5000 en 0,5x Uniblock para el anticuerpo primario; y el anticuerpo secundario fue anticuerpo dirigido contra IgG de conejo acoplada a peroxidasa (h+) purificado por afinidad (Vector, pi-1000) en una dilución 1:5000 en Uniblock.

RESULTADOS

5 Identificación de proteínas presentes en tejido de apéndice de pacientes con apendicitis. Se realizó un análisis proteómico diferencial en muestras de suero empobrecido con el objetivo de la identificación de proteínas elevadas en pacientes con apendicitis aguda. El análisis implicó comparar muestras de pacientes normales frente a pacientes con apéndices perforadas. Se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente antes de la cirugía. Un paciente normal en este estudio es uno que presentó dolor abdominal, se sometió a cirugía y se encontró que tenía un apéndice normal. Durante la cirugía se recogió tejido de apéndice normal y enfermo.

10 El enfoque proteómico fue comparar un conjunto de 4 muestras normales con un conjunto de 4 muestras con apendicitis usando electroforesis bidimensional. La Figura 5 muestra el perfil 2D de las proteínas analizadas a partir de suero empobrecido de IgG y albúmina. Se realizó la comparación entre los geles y la diferencia más obvia se indica en la Figura 5B como AP-77. La proteína en el punto de gel AP-77 se digirió con tripsina y se analizó por MALDI-TOF. Los dos péptidos resultantes tienen las siguientes secuencias: TEGDGVYTLNNEKQWINK [SEC ID N°:4] y AVGDKLPECEADDGCPKPEIAHGYVEHSVR [SEC ID N°:5]. Las secuencias se alinearon con la subunidad alfa de haptoglobina. La secuencia del precursor de haptoglobina (número de acceso de GenBank NP005134) se muestra a continuación con los fragmentos trípticos subrayados.

MSALGAVIALLLWGQLFAVDSGNDVTDIADDGCPKPEIAHGYVEHSVR
 YQCKNYYKLRTEGDGVYTLNDKKQWINKAVGDKLPECEADDGCPKPEIAHGYVE
 20 HSVRYQCKNYYKLRTEGDGVYTLNNEKQWINKAVGDKLPECEAVCGKPKNPANPV
 QRILGGHLDAGKSFQAKMVSHHLLTTGATLINEQWLLTTAKNLFNHSNATAK
 DIAPTLTLYVGGKQLVEIEKVVLPNYSQVDIGLIKQKQVSVNERVMPICLPSKDYA
 EVGRVGVVSGWGRNANFKFTDHLKYVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEKTKPKSPV
 GVQPILNEHTFCAGMSKYQEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDKSCAV
 25 AEYGVVYKVTSIQDWWQKTIAEN [SEC ID N°:6].

La Figura 6 muestra la comparación del perfil de electroforesis bidimensional entre proteínas de tejido de apéndice enfermo y normal. Se analizaron dos puntos, AP-91 y AP-93, por MALDI-TOF y se determinaron identificaciones positivas. Se determinó que la proteína AP-91 era idéntica a AP-77, la haptoglobina-alfa.

30 Haptoglobina elevada en tejido de apéndice enfermo. Con el fin de confirmar la presencia de haptoglobina en tejido enfermo se usó un anticuerpo dirigido contra haptoglobina en transferencia Western de extractos de tejido de apéndices normales y enfermos individuales. La Figura 7 muestra los datos de transferencia Western de 6 muestras normales y 6 con apendicitis. Casi cada muestra contuvo algún nivel de la subunidad beta de 38 kd; sin embargo, pareció que era un nivel elevado en los casos de apendicitis. Está presente una banda de >20 kilodalton en cada muestra de apendicitis y ausente de todas las muestras de tejido normal. Estos datos confirman los datos de cribado proteómico y muestran que la proteína es un indicador de tejido de apéndice enfermo. La subunidad alfa tiene mayor especificidad que la subunidad beta.

Ejemplo 3. Procedimiento de identificación de moléculas usando muestras de fluido

En variaciones de este ejemplo, las muestras de fluido pueden incluir sangre completa, suero o plasma. Las muestras son sangre completa recogida de pacientes humanos inmediatamente antes de una apendicectomía. Los especímenes se colocan sobre hielo y se transportan al laboratorio. Entonces, la sangre se procesa por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. Entonces, el plasma se separa vertiéndolo en otro recipiente

45 Tras la realización de una apendicectomía, un paciente se clasifica como que tiene apendicitis (AP) o sin apendicitis (NAP). La clasificación se basa en la evaluación clínica, la patología, o ambas, como se conoce en la técnica. Para los casos de apendicitis, el estado clínico también se caracteriza como tanto perforada como no perforada.

Las muestras de pacientes AP se reúnen opcionalmente y se dividen en alícuotas. Opcionalmente, una alícuota reunida se trata de manera que se eliminen componentes seleccionados tales como anticuerpos y albúmina de suero. Similarmente, las muestras de pacientes NAP se reúnen opcionalmente y se dividen en alícuotas con tratamiento opcional para eliminar los mismos componentes seleccionados. Preferentemente, las muestras AP y las muestras NAP se procesan de un modo similar.

55 A continuación, las alícuotas reunidas de muestras AP y NAP se someten cada una a electroforesis en gel bidimensional como se conoce en la técnica. Los resultados de cada tipo de muestra se comparan con respecto a la presencia, ausencia y los niveles de expresión relativos de proteínas. Preferentemente se detecta una señal correspondiente a una proteína derivada de un muestra AP que está tanto ausente como expresada a niveles relativamente menores en una muestra NAP. Se realiza caracterización adicional para una proteína AP tal.

5 La caracterización adicional puede incluir secuenciación parcial de aminoácidos, espectrometría de masas y otras técnicas analíticas como se conocen en la técnica. Puede aislarse un clon de longitud completa del gen correspondiente a la secuencia de aminoácidos parcial y expresarse como una proteína recombinante. La proteína recombinante puede usarse como un antígeno para la detección. Alternativamente puede usarse una proteína recombinante parcial o completa para inducir o de otro modo generar un reactivo de anticuerpo específico, policlonal o monoclonal. El reactivo de anticuerpo se usa en la detección del antígeno en un paciente de manera que ayuda en el diagnóstico de apendicitis. En el diagnóstico de apendicitis puede emplearse una combinación de moléculas antigénicas.

Ejemplo 4. Procedimiento de identificación de moléculas usando muestras de tejido

10 Se recogen muestras de tejido de pacientes con apendicitis (AP) y sin apendicitis (NAP). Preferentemente el tejido es el apéndice. Las muestras de tejido AP o NAP se reúnen opcionalmente de manera que se genere un conjunto de tejido AP o un conjunto de tejido NAP. Las muestras de tejido AP y NAP se usan cada una como fuente para el aislamiento de ARN total y/o ARNm. Tras el aislamiento, los ARN de AP y los ARN de NAP se mantienen por separado y se usan para la preparación de ADNc.

15 Se crea una biblioteca de sustracción usando técnicas disponibles en la materia. Opcionalmente se amplifica una biblioteca de ADNc. La biblioteca de ADNc se trata de manera que se eliminen constituyentes no deseables tales como especies altamente redundantes y especies expresadas tanto en muestras enfermas como normales. Ejemplos de las técnicas incluyen aquellas descritas por Bonaldo y col. (1996) y Deichmann M y col. (2001).

20 Tras la generación de la biblioteca de sustracción se analizan, se aíslan y se secuencian clones seleccionados correspondientes a secuencias diferencialmente expresadas en la condición de enfermedad. Usando técnicas de biología molecular se seleccionan candidatos para la expresión recombinante de una proteína parcial o completa. Entonces se usa una proteína tal como antígeno para la detección. Alternativamente puede usarse una proteína parcial o completa recombinante para inducir o de otro modo generar un reactivo de anticuerpo específico, policlonal o monoclonal. El reactivo de anticuerpo se usa en la detección de antígeno en un paciente de manera que ayuda en el diagnóstico de apendicitis. Se prevé que en el diagnóstico de apendicitis pueda emplearse una combinación de moléculas antigénicas.

Ejemplo 5. Procedimiento de diagnóstico de apendicitis mediante la evaluación de la viscosidad en muestras de plasma

30 Se extrae sangre completa de un paciente del que se sospecha que tiene apendicitis inmediatamente antes de la apendicectomía. Los especímenes se colocan sobre hielo y se transportan al laboratorio. La sangre se procesa por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos seguido de separación del plasma de la muestra vertiéndolo en otro recipiente.

35 Durante la etapa de vertido, las muestras se evalúan con respecto a la viscosidad. El aumento de la viscosidad es indicativo de apendicitis. Aproximadamente el 80% de las muestras correspondientes a casos de apendicitis muestran un aumento de la viscosidad, mientras que aproximadamente de ninguna a menos del 5% de las muestras correspondientes a casos sin apendicitis muestran un aumento de la viscosidad. Se observa que el grado de aumento de viscosidad puede establecer una correlación con la gravedad de apendicitis.

40 Las mediciones de viscosidad pueden realizarse por observación visual o usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un viscosímetro capilar Coulter Harkness (Harkness J., 1963) u otras técnicas (Haidekker MA y col., 2002).

La presencia de aumento de la viscosidad en plasma puede usarse en combinación con otras técnicas de diagnóstico, por ejemplo, con una o más de las siguientes: examen físico, hemograma completo (CBC) con o sin diferencial, análisis de orina (UA), tomografía computarizada (CT), ultrasonografía abdominal y laparoscopia.

45 Cuando se usan los términos “comprenden”, “comprende”, “comprendido” o “que comprende” en este documento deben interpretarse como que especifican la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes establecidos citados, pero no que excluyan la presencia o adición de una o varias características, número entero, etapa, componente o grupo de los mismos.

REFERENCIAS

- Aadland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Europ J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:1
- 5 Ahlquist DA, Gilbert JA. Stool markers for colorectal screening: future considerations. *Dig Dis* 1996; 14(3):13244.
- Alic M. Is fecal calprotectin the next standard in inflammatory bowel disease activity tests?. [Letter] *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94(11):3370-1.
- Arnett IDR, Watts D, Ghosh S. Review article: is clinical remission the optimum therapeutic goal in the treatment of Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:857.
- 10 Arredouani MS, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. 2005. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology*. 114(2):263-71.
- Berger D, Bolke E, Seidelmann M, Beger HG. Time-scale of interleukin-6, myeloid related proteins (MRP), C reactive protein (CRP), and endotoxin plasma levels during the postoperative acute phase reaction. *Shock* 1997; 7(6):422-6.
- 15 Berntzen HB, Endresen GK, Fagerhol MK, Spiechowicz J, Mowinckel P. Calprotectin (the L1 protein) during surgery in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51(7):643-50.
- Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, Mowinckel P, Hoyeraal HM. The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18(1):133-8.
- 20 Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; 16(11):1416-20.
- Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. The major leukocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease. *Scand J Rheumatol* 1988; Supp 76:251-6.
- Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(2):74-82.
- 25 Berstad A, Arslan G, Folvik G. Relationship between intestinal permeability and calprotectin in gut lavage fluid. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(1):64-9.
- Bjarnason I, Sherwood R. Fecal calprotectin: a significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Pediatr Gastroent Nutr* 2001; 33:11.
- 30 Bjerke K, Halstensen TS, Jahnsen F, Pulford K, Brandtzaeg P. Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes. *Gut* 1993; 34(10):1357-63.
- Bogumil T, Rieckmann P, Kubuschok B, Felgenhauer K, Bruck W. Serum levels of macrophage-derived protein MRP-8/14 are elevated in active multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 1998; 247(2-3):195-7
- 35 Bonaldo MF y col., 1996. Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate Gene discovery. *Genome Res*. 6:791-806.
- Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. I. Comparison with other leukocyte markers by paired immunofluorescence and immunoenzyme staining. *Am J Clin Pathol* 1987; 87(6):681-99.
- 40 Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *Am J Clin Pathol* 1987; 87(6):700-7.
- Brandtzaeg P, Dale I, Gabrielsen TO. The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. *Histopathol* 1992; 21(2):191-6.
- 45 Brun JG, Cuida M, Jacobsen H, Kloster R, Johannesen AC, Hoyeraal HM, Jonsson R. Sjögren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva. *Scand J Rheumatol* 1994; 23(3):114-8.
- Brun JG, Haga HJ, Boe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB, Fagerhol MK. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol* 1992; 19(6):859-62.

- Brydon WG, Campbell SS, Anderson NA, Wilson RG, Ghosh S. Faecal calprotectin levels and colorectal neoplasia. *Gut* 2001; 48(4):579-80.
- Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32(2):171-7
- 5 Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33:11.
- Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA, and U Kunzendorf 2001. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 12:1947-57.
- 10 Clark BR, Kelly SE, Fleming S. Calgranulin expression and association with the keratinocyte cytoskeleton. *J Pathol* 1990; 160(1):25-30
- Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK, Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Am J Clin Pathol* 1985; 84(1):24-34.
- 15 Dale I, Brandtzaeg P. Expression of the epithelial L1 antigen as an immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathol* 1989; 14(5):493-502.
- Dale I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50(8) :837-41.
- 20 Deichmann, M., Polychronidis, M., Wacker, J., Thome, M. & Naher, H., 2001. The protein phosphatase 2A subunit Bg gene is identified to be differentially expressed in malignant melanomas by subtractive suppression hybridization. *Melanoma Research* 2001 (11): 1-9.
- Dobryszczycka W. 1997. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35(9):647-54.
- 25 Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(7):303-7.
- Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. The distribution of the antimicrobial protein, calprotectin, in normal oral keratinocytes. *Arch Oral Biol* 1992; 37(11):963-8.
- 30 Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P, Dale I. Calprotectin (The L1 Leukocyte Protein) In: VL Smith & JR Dedman (Eds): *Stimulus Response Coupling. The Role of Intracellular Calcium-Binding Proteins*, CRC Press, Boca Raton, Fla., USA, 1990, pp. 187-210.
- Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 356(9244):1783-4.
- 35 Flum DR y col., 2001. Has misdiagnosis of appendicitis decreased over time? A population-based analysis. *JAMA* 286 (14):1748-1753.
- Fosse E, Moen O, Johnson E, Semb G, Brockmeier V, Mollnes TE, Fagerhol MK, Venge P. Reduced complement and granulocyte activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery* 1994; 58(2):472-7.
- 40 Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C, Harms E, Sorg C, and J Roth 2000. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:628-37.
- Gabrielsen TO, Brandtzaeg P, Hoel PS, Dale I. Epithelial distribution of a myelomonocytic antigen L1 in relation to cutaneous malignancies and melanocytic naevi. *Br J Dermatol* 1988; 118(1):59-67.
- 45 Gabrielsen TO, Dale I, Brandtzaeg P, Hoel PS, Fagerhol MK, Larsen TE, Thune PO. Epidermal and dermal distribution of a myelomonocytic antigen (L1) shared by epithelial cells in various inflammatory skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(2 Pt 1):173-9.
- Garred P, Fosse E, Fagerhol MK, Videm V, Mollnes TE. Calprotectin and complement activation during major operations with or without cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery* 1993; 55(3):694-9.

- Gasché, C., 2005. Laboratory Tests-What Do They Tell Us?, Falk Symposium Abstract, June 17-18, 2005, Munich, Germany.
- Gaya DR, Mackenzie JF. Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease. *Q J Med* 2002; 95:557 (editorial).
- 5 Gilbert JA, Ahlquist DA, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Rubin J, Ellefson RD. Fecal marker variability in colorectal cancer: calprotectin versus hemoglobin. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(10):1001-5.
- Golden BE, Clohessy PA, Russell G, Fagerhol MK. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 1996; 74(2):136-9.
- 10 Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993; 2(1):47-50.
- Haidekker MA y col., 2002. A novel approach to blood plasma viscosity measurement using fluorescent molecular rotors. *Am J Physiol Heart Circ Physio* 282:H1609-H1614.
- 15 Hammer HB, Kvien TK, Glennas A, Melby K. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13(1):59-64.
- Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Arai H, Kanaoka K, Iwasaki T, Nakamura A, Hosoda Y, Shirai N; Hirasawa K, Takahira K, Kataoka H, Sano M, Osawa M, Sugimoto S. Clinical significance of faecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2003; 100:21.
- Harkness J., 1963. A new method for the measurement of plasma viscosity. *Lancet* 2:280 -281.
- 20 Hetland G, Berntzen HB, Fagerhol MK. Levels of calprotectin (leukocyte L1 protein) during apheresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52(6):479-82.
- Homann C, Garred P, Graudal N, Hasselqvist P, Christiansen M, Fagerhol MK, Thomsen AC. Plasma calprotectin: a new prognostic marker of survival in alcohol-induced cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21(4):979-85.
- 25 Hsieh HL, Schafer BW, Weigle B, and CW Heizmann 2004 S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316:949-59.
- Hycult Biotechnology b.v., ELISA Test Kit for Human Calprotectin information sheet, Catalog No. HK325.
- Hycult Biotechnology b.v., Monoclonal Antibody to Human S100A8/A9 (MRP-8/MRP-14), calprotectin Clone 27E10 information sheet, Catalog No. HM2156.
- 30 Ikemoto, M. y col. 2003. New ELISA System for Myeloid-related Protein Complex (MRP8/14) and its Clinical Significance as a Sensitive Marker for Inflammatory Responses Associated with Transplant Rejection, *Clin. Chem.* 49:594-600.
- Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Molecular Pathology* 1997; 50(3):113-23.
- 35 Johne B, Kronborg O, Ton HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(3):291-6.
- Katnik y col., 1989. Monoclonal Antibodies Against Human Haptoglobin. *Hybridoma* 8 (5):551-560.
- 40 Kelly SE, Hunter JA, Jones DB, Clark BR, Fleming S. Morphological evidence for calcium-dependent association of calgranulin with the epidermal cytoskeleton in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 1991; 124(5):403-9.
- Kelly SE, Jones DB, Fleming S. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. *J Pathol* 1989; 159(1):17-21.
- Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1448(2):200-11.
- 45 Kjeldsen-Kragh J, Mellbye OJ, Haugen M, Mollnes TE, Hammer HB, Sioud M, Forre O. Changes in laboratory variables in rheumatoid arthritis patients during a trial of fasting and one-year vegetarian diet. *Scand J Rheumatol* 1995; 24(2):85-93.

- Koike T, Kondo K, Makita T, Kajiyama K, Yoshida T, Morikawa M. Intracellular localization of migration inhibitory factor-related protein (MRP) and detection of cell surface MRP binding sites on human leukemia cell lines. *J Biochem* 1998; 123(6):1079-87.
- 5 Kristinsson J, Armbruster CH, Ugstad M, Kriwanek S, Nygaard K, Ton H, Fuglerud P. Fecal excretion of calprotectin in colorectal cancer; relationship to tumor characteristics. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(2):202-7.
- Kristinsson J, Roseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H, Borner OP, Raknerud N, Nygaard K. Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma. *Diseases of the Colon & Rectum* 1998; 41(3):316-21.
- Kronborg O, Ugstad M, Fuglerud P, Johne B, Hardcastle J, Scholefield JH, Vellacott K, Moshakis V, Reynolds JR. Faecal calprotectin levels in a high risk population for colorectal neoplasia. *Gut* 2000; 46(6):795-800.
- 10 Kumar, R.K. y col. 2001. Dimeric S100A8 in human neutrophils is diminished after phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 70(1):59-64.
- Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ and AR Zinsmeister 2000. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol*, 10:2831-7.
- 15 Limburg PJ. Ahlquist DA. Sandborn WJ. Mahoney DW. Devens ME. Harrington JJ. Zinsmeister AR. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(10):2831-7.
- Longbottom D, Sallénave JM, van Heyningen V. Subunit structure of calgranulins A and B obtained from sputum, plasma, granulocytes and cultured epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992; 1120(2):215-22.
- 20 Lugerling N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. The myeloid related protein MRP8/14 (27E10 antigen)-usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Europ J Clin Invest* 1995; 25(9):659-64.
- Meling TR, Aabakken L, Roseth A, Osnes M. Faecal calprotectin shedding after short-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1996; 31(4):339-44.
- 25 Moen O, Fosse E, Braten J, Andersson C, Fagerhol MK, Venge P, Hogasen K, Mollnes TE. Roller and centrifugal pumps compared in vitro with regard to haemolysis, granulocyte and complement activation. *Perfusion* 1994; 9(2):109-17.
- Muller F, Froland SS, Aukrust P, Fagerhol MK. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *J Acq Immune Defic Syndr* 1994; 7(9):931-9.
- 30 Muller, F. y col. 1994. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events, *J. Acqui. Immune Defic. Syndr.* 7(9):931-939.
- Neary, Walter, 2001. Press Release from University of Washington, Misdiagnosis of appendicitis continues despite new tools.
- 35 Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002; 91:45.
- Pekna M, Borowiec J, Fagerhol MK, Venge P, Thelin S. Biocompatibility of heparin-coated circuits used in cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 28(1):5-11.
- 40 Power, C. y col., 2005. Raised faecal calprotectin levels in patients presenting with right iliac fossa pain warrant mandatory laparoscopy: a non-invasive predictor of acute appendicitis, *Thieme connect, Endoscopy* 37:DOI:10.1055/2-2005-868524.
- Power, C. y col. 2004, Irish Society of Gastroenterology Winter Meeting Program Oral Presentation Raised Faecal Calprotectin Levels in Patients Presenting with Right Iliac Fossa Pain Warrant Mandatory Laparoscopy: A Non-invasive Predictor of Acute Appendicitis.
- 45 Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, and N. Hogg 2002 The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 277:3658-65.
- Roseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Oct;39(10):1017-20.

- Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(9):793-8.
- Roseth AG, Kristinsson J, Fagerhol MK, Schjonsby H, Aadland E, Nygaard K, Roald B. Faecal calprotectin: a novel test for the diagnosis of colorectal cancer? *Scand J Gastroenterol* 1993; 28(12):1073-6.
- 5 Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58(2):176-80.
- Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27(9):793-8.
- 10 Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1999; 34(1):50-4.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, and PA Tessier 2003 Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol.* 170:3233-42.
- 15 Saintigny G, Schmidt R, Shroot B, Juhlin L, Reichert U, Michel S. Differential expression of calgranulin A and B in various epithelial cell lines and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 1992; 99(5):639-44.
- Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44(4):357-62.
- 20 Semb AG, Gabrielsen TO, Halstensen TS, Fagerhol MK, Brandtzaeg P, Vaage J. Cardiac surgery and distribution of the leukocyte L1 protein-calprotectin. *Europ J Cardio-Thoracic Surgery* 1991; 5(7):363-7.
- Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterol* 2001; 120:622.
- Stockley RA, Dale I, Hill SL, Fagerhol MK. Relationship of neutrophil cytoplasmic protein (L1) to acute and chronic lung disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44(7):629-34.
- 25 Striz, I. and I. Trebichavsky 2004. Calprotectin - a Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation. *Physiol Res.* 53:245-253.
- Thomas P, Rihani H, Roseth A, Sigthorsson G, Price A, Nicholls RJ, Bjarnason I. Assessment of ileal pouch inflammation by single-stool calprotectin assay. *Diseases of the Colon & Rectum* 2000; 43(2):214-20.
- 30 Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Fagerhol MK, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001; 49:402.
- Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47(4):506-13.
- Tibble JA, Bjarnason I. Department of Medicine, Guy's, King's, St Thomas's Medical School, Bessemer Road, London SE5 9PJ, UK. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease.
- 35 Tibble JA, Bjarnason I. Department of Medicine, Guy's, King's, St. Thomas's Medical School, London, UK. Fecalcalprotectin as an index of intestinal inflammation.
- Tibble JA, Bjarnason I. Markers of intestinal inflammation and predictors of clinical relapse in patients with quiescent IBD. *Medscape Gastroenterol* 2001; 3 (2).
- 40 Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.
- Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Scott D, Fagerhol MK, Roseth A, Bjarnason I. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 1999; 45(3):362-6.
- 45 Ton H, Brandsnes, Dale S, Holtlund J, Skuibina E, Schjonsby H, Johne B. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292(1-2):41-54.
- Tungekar MF, Heryet A, Gatter KC. The L1 antigen and squamous metaplasia in the bladder. *Histopathol* 1991; 19(3):245-50.

Patente de EE.UU. nº 5.350.687, Odink y col., 27 de septiembre de 1994, Antibodies which bind to novel lymphokine related peptides.

Patente de EE.UU. nº 5.455.160, Fagerhol y col., Diagnostic test and kit for disease disorders in the digestive system.

5 Patente de EE.UU. nº 5.552.295, Stanker y col., 3 de septiembre de 1996, Monoclonal antibodies to bovine haptoglobin and methods for detecting serum haptoglobin levels.

Patente de EE.UU. nº 6.451.550, Eckersall, 17 de septiembre de 2002, Haptoglobin assay.

Patente de EE.UU. nº 20030224452, Colgin y col., Pregnancy Detection.

10 Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Science* 1988; 91 (Pt 2):221-30.

Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider LJ, Schorge JO, Berkowitz RS, Mok SC. 2003 Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 9(8):2904-11.

15 Yerly S, Bouvier M, Rougemont A, Srivastava I, Perrin LH. 1990. Development of a haptoglobin ELISA. Its use as an indicator for malaria. *Acta Trop.* 1990 47(4):237-44.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AspenBio Pharma, Inc.

<120> Procedimientos y dispositivos para el diagnóstico de apendicitis

<130> EPP96908

5 <140> WO 2006/012588 (EP 05775574.6)

<141> 25.07.2005

<150> US 60/590.631

<151> 23.07.2004

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

Asn	Ile	Glu	Thr	Ile	Ile	Asn	Thr	Phe	His	Gln	Tyr	Ser	Val	Lys
1				5					10					15

<210> 2

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <400> 2

Leu	Gly	His	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Phe	Lys	Glu	Leu	Val
1				5					10					15	

Arg

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

ES 2 359 822 T3

<400> 3

Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile
1 5 10 15

Asn Thr Phe His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu
20 25 30

Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln Asn Phe
35 40 45

Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile Met Glu
50 55 60

Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile
65 70 75 80

Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu
85 90 95

Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Pro

<210> 4

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn Glu Lys Gln Trp Ile
1 5 10 15

Asn Lys

10

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido sintético

<400> 5

Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg
 20 25 30

<210> 6

<211> 406

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Ala Leu Gly Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Trp Gly Gln Leu
 1 5 10 15

Phe Ala Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly
 20 25 30

Cys Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val
 35 40 45

Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly
 50 55 60

ES 2 359 822 T3

Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly
65 70 75 80

Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro Lys Pro Pro
85 90 95

Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys
100 105 110

Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn
115 120 125

Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu
130 135 140

Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln
145 150 155 160

Arg Ile Leu Gly Gly His Leu Asp Ala Lys Gly Ser Phe Pro Trp Gln
165 170 175

Ala Lys Met Val Ser His His Asn Leu Thr Thr Gly Ala Thr Leu Ile
180 185 190

Asn Glu Gln Trp Leu Leu Thr Thr Ala Lys Asn Leu Phe Leu Asn His
195 200 205

Ser Glu Asn Ala Thr Ala Lys Asp Ile Ala Pro Thr Leu Thr Leu Tyr
210 215 220

Val Gly Lys Lys Gln Leu Val Glu Ile Glu Lys Val Val Leu His Pro
225 230 235 240

Asn Tyr Ser Gln Val Asp Ile Gly Leu Ile Lys Leu Lys Gln Lys Val
245 250 255

ES 2 359 822 T3

Ser Val Asn Glu Arg Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Asp Tyr
 260 265 270

Ala Glu Val Gly Arg Val Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Asn Ala
 275 280 285

Asn Phe Lys Phe Thr Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu Pro Val Ala
 290 295 300

Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg His Tyr Glu Gly Ser Thr Val Pro Glu
 305 310 315 320

Lys Lys Thr Pro Lys Ser Pro Val Gly Val Gln Pro Ile Leu Asn Glu
 325 330 335

His Thr Phe Cys Ala Gly Met Ser Lys Tyr Gln Glu Asp Thr Cys Tyr
 340 345 350

Gly Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ala Val His Asp Leu Glu Glu Asp Thr
 355 360 365

Trp Tyr Ala Thr Gly Ile Leu Ser Phe Asp Lys Ser Cys Ala Val Ala
 370 375 380

Glu Tyr Gly Val Tyr Val Lys Val Thr Ser Ile Gln Asp Trp Val Gln
 385 390 395 400

Lys Thr Ile Ala Glu Asn
 405

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de uso en el diagnóstico de apendicitis en un paciente del que se sospecha que tiene apendicitis que comprende probar la presencia de MRP-8/14, a un nivel diagnóstico de apendicitis, en una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenido del paciente.
- 5 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho paciente presenta al menos un síntoma clásico de apendicitis seleccionado del grupo que consiste en: dolor en el abdomen; dolor que empieza cerca del ombligo, luego se mueve al cuadrante derecho inferior del abdomen; anorexia (pérdida del apetito); problemas de alimentación acompañados de somnolencia; náuseas que empiezan después de la aparición de dolor; vómitos que empiezan después de la aparición de dolor; vómitos acompañados de fatiga; estreñimiento; heces pequeñas con mucosidad; diarrea; incapacidad para eliminar los gases; febrícula; distensión abdominal; dolor en el abdomen que empeora; tenesmo; fiebre alta; leucocitosis; y aumento de la viscosidad del plasma.
- 10 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho paciente presenta dos o más de dichos síntomas clásicos de apendicitis.
- 15 4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 realizado en un dispositivo de ensayo inmunológico.
- 20 5. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que no se sabe que el paciente tiene una afección interferente asociada a la presencia de MRP-8/14 en una muestra del tipo en el que se prueba MRP-8/14, en el que dicha afección interferente se selecciona del grupo que consiste en aloinjerto reciente; septicemia; meningitis; neumonía; tuberculosis; artritis reumatoide; cáncer gastrointestinal; enfermedad inflamatoria del intestino; cáncer de piel, periodontitis, preeclampsia y SIDA.
- 25 6. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que se prueba un nivel de MRP-8/14 superior a aproximadamente 10 µg/ml de MRP-8/14 que es diagnóstico de apendicitis.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que se prueba un nivel de MRP-8/14 superior a aproximadamente 11 µg/ml de MRP-8/14.
- 30 8. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que se prueba un nivel de MRP-8/14 superior a aproximadamente 15 µg/ml de MRP-8/14.
9. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que un nivel de MRP-8/14 superior a aproximadamente 20 µg/ml de MRP-8/14 es diagnóstico de apendicitis.
- 35 10. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que se prueba al menos una molécula adicional diferencialmente asociada a apendicitis, en el que dicha al menos una molécula adicional se selecciona del grupo que consiste en: inhibidor 1 del activador de plasminógeno, proteínas de unión a ácidos grasos, factor kappa beta nuclear (NFκB), ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores, y
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que se prueba un nivel de haptoglobina superior a 139 mg/dl.
12. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que se prueba un nivel de haptoglobina superior a 150 mg/dl.
13. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho MRP-8/14 y dicha al menos una molécula adicional se prueban probando la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho MRP-8/14 o dicha al menos una molécula adicional en dicha muestra.
14. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho MRP-8/14 se prueba para usar el anticuerpo 27e10.



FIGURA 1A

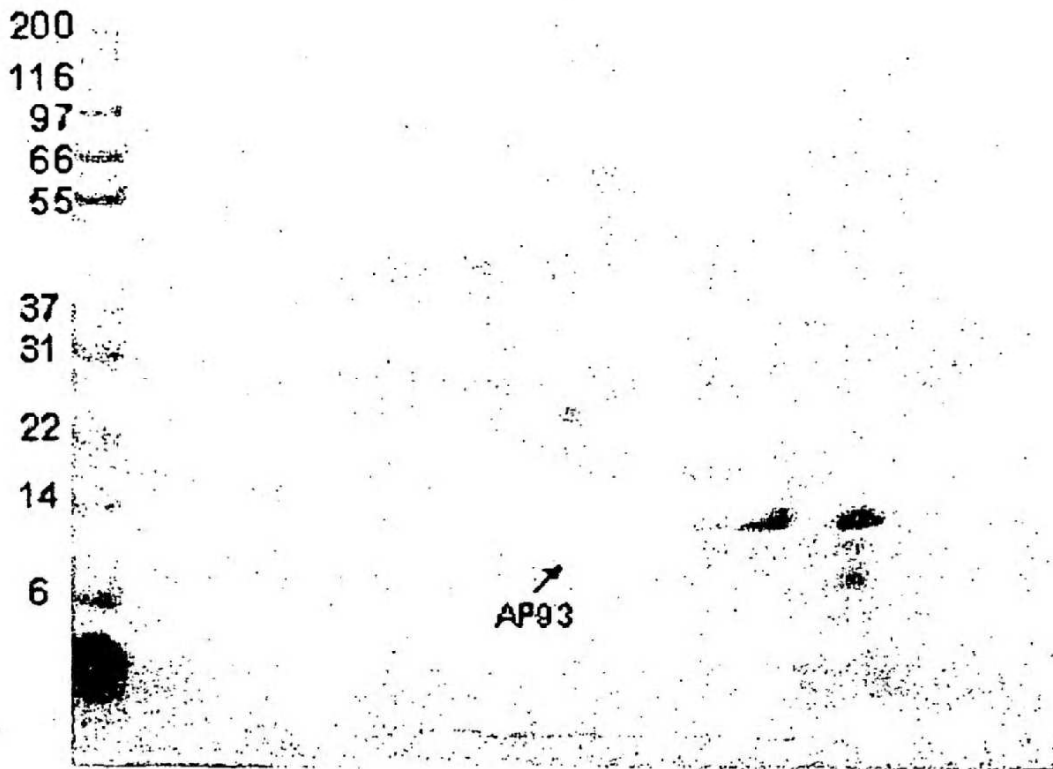


FIGURA 1B

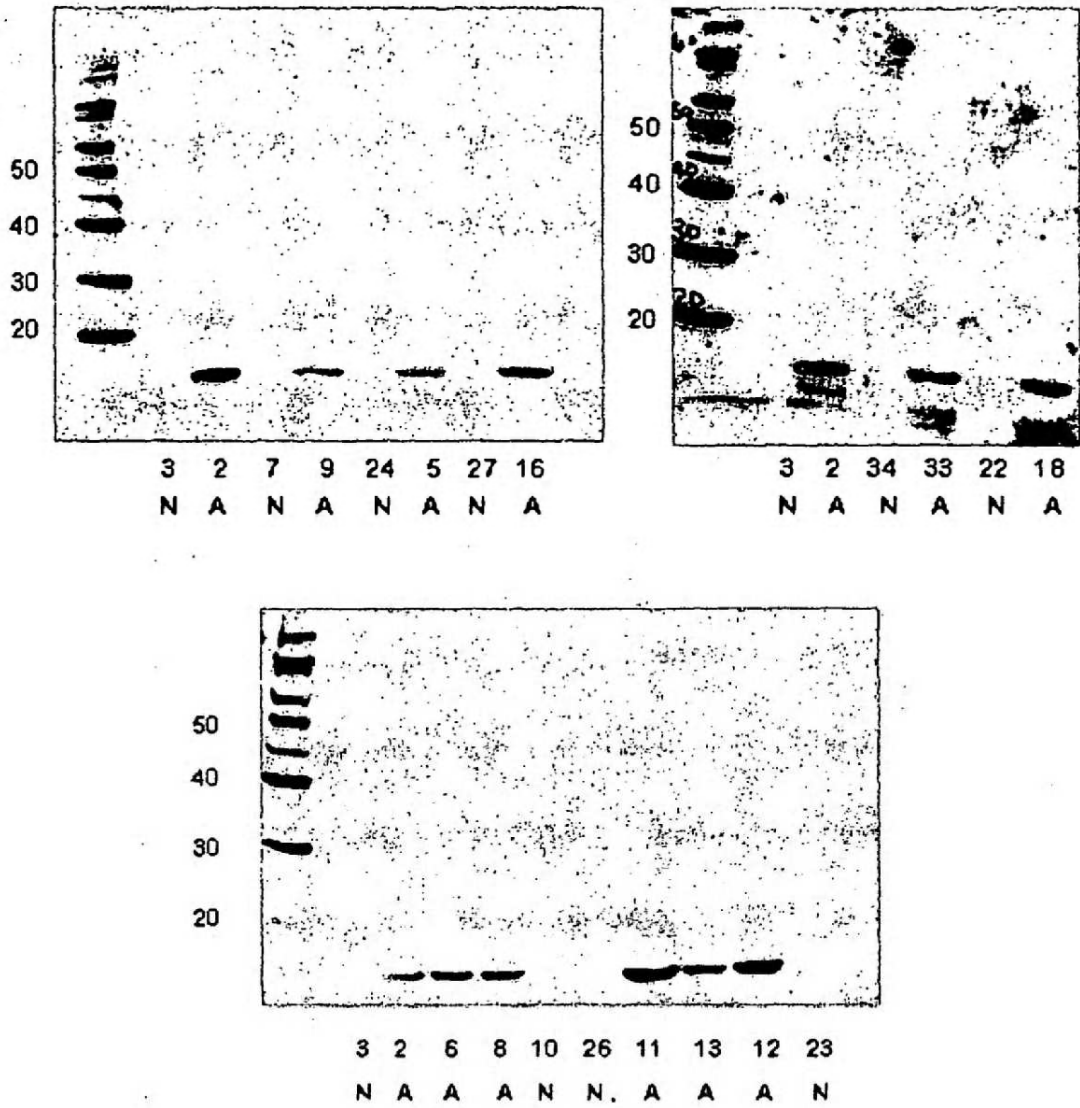
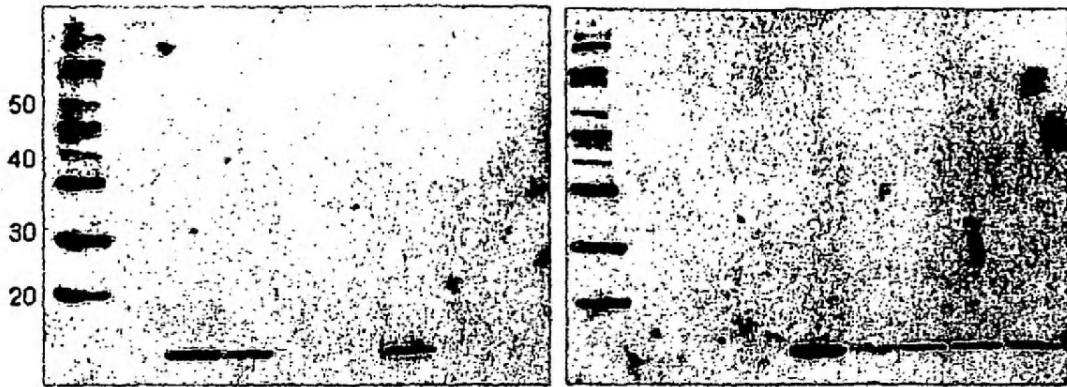


FIGURA 2



3 2 9 7 27 16 24
N A A N N A N

33 34 22 18 1 4 6 8
A N N A A A A A



10 26 11 13 12 23 14 32
N N A A A N A N

FIGURA 3

Valores relativos de MRP 8/14 en suero

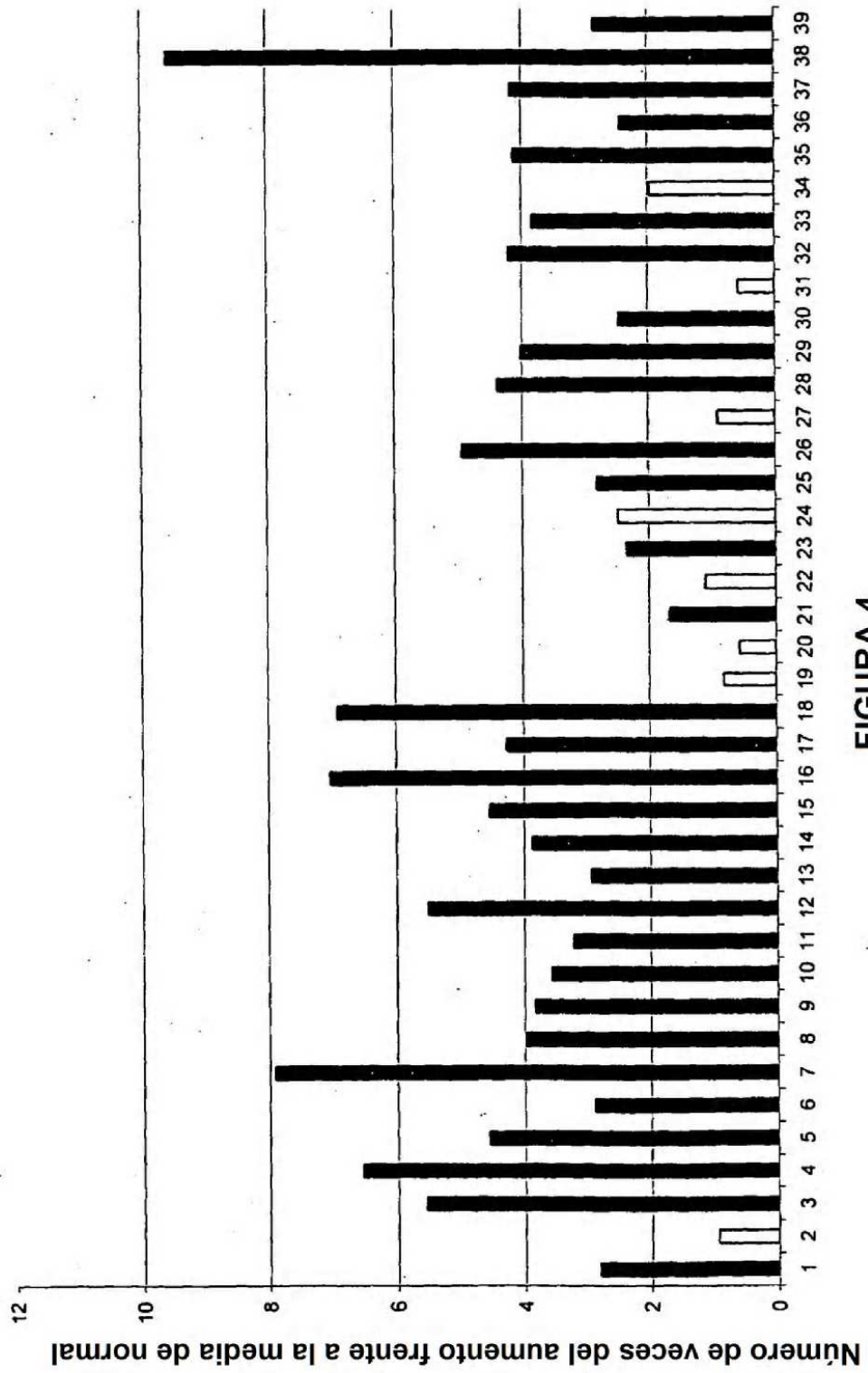


FIGURA 4



FIGURA 5A

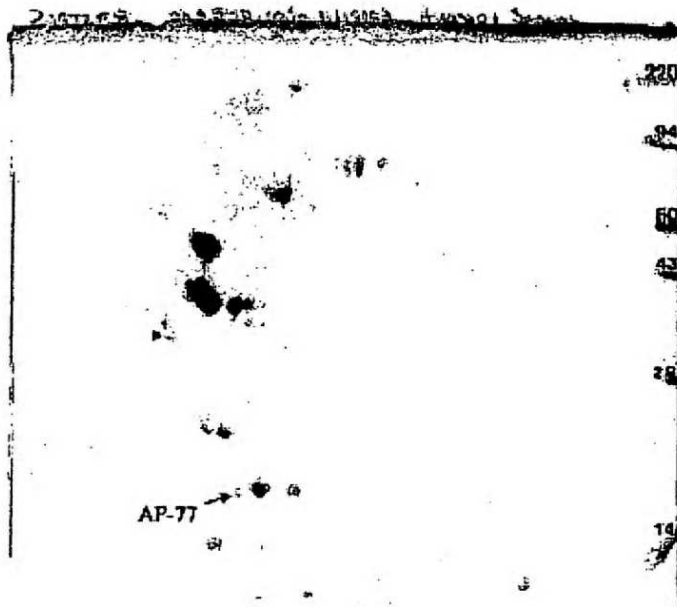


FIGURA 5B



FIGURA 6A

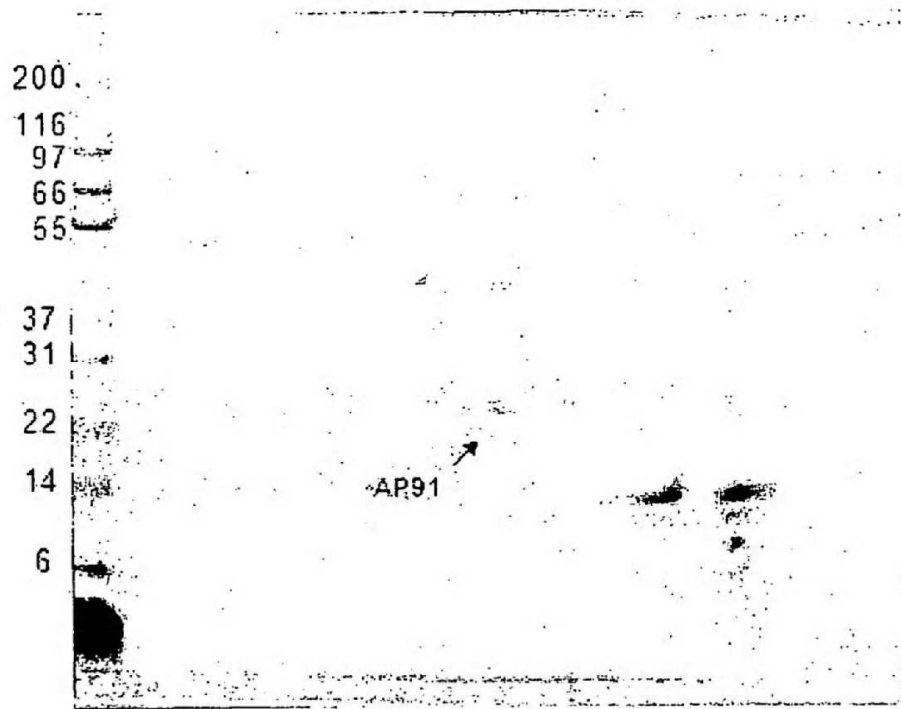


FIGURA 6B

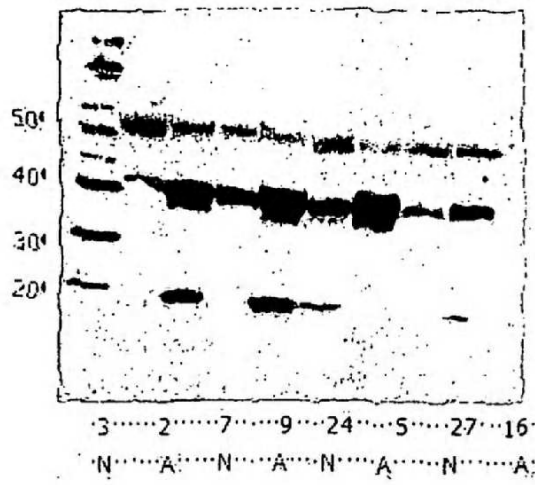


FIGURA 7A

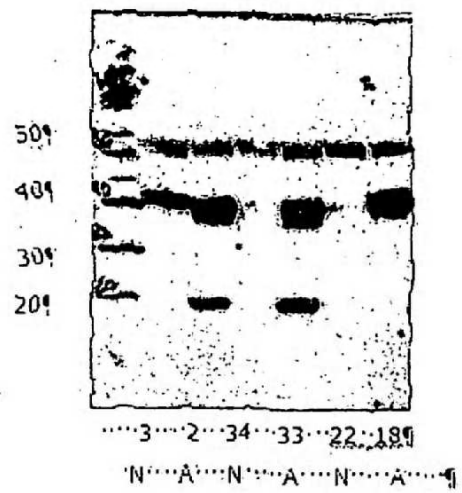


FIGURA 7B