

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 150**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2017** **PCT/EP2017/074405**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018** **WO18055209**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2017** **E 17780351 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020** **EP 3516399**

54 Título: **Diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) mediante la detección de glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2A)**

30 Prioridad:

26.09.2016 EP 16190594

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

26.07.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROGGENBUCK, DIRK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 845 150 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) mediante la detección de glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2A)

5 La invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a). En particular la invención proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende proporcionar una muestra de un sujeto humano que presenta síntomas de enfermedad pancreática, en el que dicha muestra se obtiene del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de dichos síntomas, y proporciona un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b), y pone en contacto dicha muestra con dicho reactivo de afinidad capturando de ese modo GP2a de dicha muestra, y determinando la concentración de GP2a de dicha muestra, en el que la determinación de una concentración de GP2a en dicha muestra que es mayor que la concentración media de GP2a en muestras de control indica la presencia de PA y la ausencia de pancreatitis crónica y cáncer pancreático, y opcionalmente uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis. La invención además proporciona un kit y un sistema desarrollado para llevar a cabo el método reivindicado y determinar la concentración de GP2a y realizar un análisis automatizado de una o más muestras.

20 Antecedentes de la invención

El diagnóstico serológico de la pancreatitis aguda (PA), una afección inflamatoria aguda del páncreas y la principal causa de hospitalización en caso de dolor abdominal agudo en países desarrollados como los Estados Unidos [1], es todavía un reto de laboratorio.[2] Por lo tanto, la investigación de los parámetros serológicos para el diagnóstico de PA continúa sin cesar.

La incidencia de PA, la cual permanece como una enfermedad mortal con una tasa de mortalidad de hasta el 40 % en PA grave, oscila de 17,5 a 73,4 casos por 100.000 individuos a nivel mundial.[2] Aunque la patofisiología de PA aún no se entiende completamente, actualmente se admite ampliamente que la activación intrapancreática prematura de las proenzimas digestivas en particular tripsinógeno almacenado en vesículas pancreáticas denominadas gránulos de zimógeno (GZ) por cathepsina B u otros péptidos activos juega un papel crucial.[3-7] Por tanto, la aparición de PA se caracteriza por lesión de célula acinar que da como resultado una polaridad alterada de secreción de proenzima y la extrusión posterior de GZ y la liberación de su contenido a través de la membrana basolateral dentro del intestino.[4] La consiguiente respuesta inflamatoria celular mediada por macrófagos y neutrófilos hasta la formación de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos puede conducir a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica e incluso a choque sistémico.[8] Por tanto, la pérdida de moléculas relacionadas con GZ tipo lipasa y amilasa pancreática o tripsinógeno así como la inducción y la liberación de citocinas inflamatorias tales como interleuquina 6 y 8 (CXC8L) por células inmunitarias implicadas en la corriente sanguínea genera una plétora de marcadores específicos a PA serológicos potenciales.[9] Sin embargo, a pesar de la identificación continua de nuevos biomarcadores potenciales por tecnologías proteómicas emergentes, el análisis de lipasa en suero es todavía la única herramienta serológica con alta solidez de evidencia para el diagnóstico de la enfermedad según la Clasificación de Atlanta 2012 de PA revisada.[10] Los niveles elevados deberían superar 3 veces el límite superior de lo normal. Actualmente se prefiere el análisis de lipasa en suero al análisis de amilasa debido a su sensibilidad incrementada.[11] Sin embargo, se ha informado de análisis de lipasa falso positivo en 51 (23,2 %) pacientes no PA principalmente con cirrosis descompensada e insuficiencia renal por un análisis prospectivo de 221 pacientes consecutivos con hallazgos de lipasa elevada recientemente.[12]

Cabe destacar que, se usa proteína reactiva C (CRP) en suero para la evaluación de la gravedad de PA en cuyos niveles por encima de 150 mg/dl (14.286 nmol/l) son indicativos de un curso grave de PA.[13] Además, se recomienda procalcitonina (PCT) como marcador útil en la predicción temprana de PA grave, necrosis pancreática, e insuficiencia orgánica.[10; 14]

Marcadores de PA en suero adicionales tipo isoamilasa pancreática, elastasa pancreática, tripsina, péptido activado por tripsinógeno urinario, tripsinógeno 2 y 3 de suero, fosfolipasa A2 y péptido de activación de carboxipeptidasa B se han añadido a la lista creciente de marcadores de PA putativos.[2; 9]. Debido a diversas razones, tal como la precisión diagnóstica inferior o el análisis laborioso, estos nuevos marcadores aún no se han implementado mucho en diagnósticos rutinarios.

En la investigación en desarrollo para los nuevos parámetros específicos a PA, un modelo animal bien caracterizado de PA reveló gran elevada glicoproteína 2 (GP2) de membrana de GZ en suero como marcador potencial para PA.[15] Como las proenzimas digestivas, GP2 se libera dentro del conducto pancreático tras la estimulación pancreática exocrina.[16] Por el contrario, sin embargo, GP2 se une a la membrana de GZ por un anclaje de glicosilo-fosfatidilinositol (GPI) escindible por fosfolipasa C.[17; 18]

Cabe destacar que, se describieron dos isoformas de GP2, denominadas alfa (GP2a) y beta (GP2b), ambas expresadas a niveles iguales en el páncreas.[19; 27] Las dos variantes de GP2 se producen en seres humanos

debido a corte y empalme alternativo. Además de la forma grande de GP2, que contiene 537 aminoácidos y denominada alfa, existe una forma beta más corta que comprende solo 390 aminoácidos. En la actualidad, se han descrito cuatro isoformas de GP2 (véanse las tablas 1 a 3 de la descripción detallada de la invención).

- 5 Curiosamente, GP2 evidentemente liberada por la membrana basolateral de células acinosas dentro de la corriente sanguínea demostró un aclaramiento más lento en suero en comparación con los niveles de lipasa y amilasa en la PA inducida por cerúleo en ratas.[15] Posteriormente, los niveles significativamente más altos de GP2 humana se podrían detectar mediante una investigación por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en pacientes con PA en comparación con los controles.[20] Notablemente, la cuantificación de GP2 en plasma mostró una
10 precisión de ensayo mejor y al menos 1 día más niveles incrementados en pacientes con PA en comparación con el análisis de lipasa y amilasa establecido.

- Sin embargo, también se observaron concentraciones elevadas de GP2 en pacientes con pancreatitis crónica (PC) y cáncer pancreático (CP) por este ensayo. El documento US2007275422 describe un método para determinar si un
15 sujeto humano tiene o no una enfermedad pancreática, entre la que se incluye pancreatitis aguda y crónica y cáncer pancreático. Estos últimos hallazgos, sin embargo, cuestionaron la asociación de GP2 en suero con la inflamación fulminante característica para PA y por consiguiente la utilidad clínica de GP2 como marcador específico a PA.

- Hay una necesidad urgente de establecer medios técnicos mejorados para detectar marcadores serológicos que son
20 específicos para PA y permiten el diagnóstico de PA con una precisión mayor en comparación con las pruebas usadas en la materia. Urgentemente se necesitan métodos de diferenciación entre PA y otras enfermedades pancreáticas, tales como PC y CP, especialmente en fases tempranas de la enfermedad.

Sumario de la invención

- 25 A la luz de la técnica anterior el problema técnico subyacente de la presente invención es la provisión de medios para diagnosticar pancreatitis aguda (PA) que sean más precisos y preferentemente capaces de un diagnóstico más temprano que aquellos medios conocidos en la técnica anterior. Un problema adicional a resolver se puede considerar la provisión de medios para diferenciar entre PA y otras enfermedades pancreáticas, entre las que se
30 incluyen pancreatitis crónica, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis, en particular en una fase temprana de la enfermedad o en un momento temprano después de existir síntomas.

- El problema se resuelve por la invención según las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se
35 proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- 40 - proporcionar una muestra de un sujeto humano que presenta síntomas de enfermedad pancreática, en el que dicha muestra se obtiene del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de dichos síntomas,
- proporcionar un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b),
45 - poner en contacto dicha muestra con dicho reactivo de afinidad capturando de ese modo GP2a de dicha muestra, y
- determinar la concentración de GP2a de dicha muestra,
50 en el que la determinación de una concentración de GP2a en dicha muestra que es mayor que la concentración de GP2a en una o más muestras de control indica la presencia de PA y la ausencia de pancreatitis crónica y cáncer de páncreas, y opcionalmente la ausencia de uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

- 55 En el momento de la invención se desconocía completamente que la detección de GP2a podría usarse para diferenciar pacientes que padecen PA de pacientes que padecen otras enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas, entre las que se incluyen pancreatitis crónica, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

- 60 En particular, el método de la presente invención proporciona medios para determinar, en un momento temprano, tal como cuando los síntomas se clasifican como síntomas agudos de la enfermedad pancreática, la presencia de PA, de manera que se puede descartar la presencia de otras enfermedades pancreáticas. A la luz de la técnica anterior, que generalmente enseña que las múltiples enfermedades pancreáticas hay que evaluarlas por niveles de GP2, la presente invención representa un hallazgo inesperado.

- 65 Los informes previos [20] habían indicado que GP2 es elevada en pacientes con PA, pancreatitis crónica y cáncer

de páncreas en un grado similar, lo cual no hizo posible diferenciar entre las enfermedades. Por lo tanto, es incluso más sorprendente, que la detección específica de GP2a, preferentemente a diferencia de la cantidad total de GP2 (GP2t), permita la diferenciación entre PA y otras enfermedades pancreáticas. Por lo tanto, la presente invención representa una mejora sustancial de los medios técnicos disponibles para el diagnóstico serológico de PA en

La detección de los niveles de GP2t en muestras de sujetos humanos que padecen síntomas de PA para el diagnóstico de PA da como resultado un número mayor de pacientes falsamente diagnosticado como que padece PA en comparación con la detección de GP2a en las mismas muestras. Por lo tanto, la detección de GP2a proporciona una especificidad mucho mayor en comparación con la detección de GP2t, con una tasa de falsos positivos menor en todos los grupos control, que consisten en individuos sanos y pacientes que padecen enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas, entre las que se incluyen, sin limitación, pancreatitis crónica, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis. El análisis de GP2a probó ser superior en términos de precisión diagnóstica en comparación con todas otras pruebas serológicas para el diagnóstico de PA.

De acuerdo con la presente invención, la muestra usada para determinar la concentración de GP2a se obtiene del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de los síntomas. Era completamente sorprendente, que los niveles de GP2a sean específicamente elevados en pacientes con PA en este momento temprano después de la ocurrencia de síntomas de la enfermedad, y que esto no sea el caso de las enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas. La posibilidad de diagnóstico temprano de PA y la exclusión de otras enfermedades, como se habilita por el método *in vitro* según la presente invención, tiene importantes implicaciones sobre las intervenciones terapéuticas a iniciar después de recibir el paciente y realizar el diagnóstico *in vitro* y por lo tanto contribuirá mucho al tratamiento mejorado de pacientes que padecen PA.

Es particularmente sorprendente que el aislamiento de la muestra usada en el método de la presente invención, cuando ocurre dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de los primeros síntomas, permita la diferenciación de pancreatitis aguda (PA) de otras enfermedades pancreáticas tales como pancreatitis crónica (PC) o cáncer de páncreas, puesto que se ha demostrado que en PA los niveles de GP2 permanecen anormalmente elevados durante al menos 5 días a partir de la ocurrencia de los primeros síntomas [20]. Asimismo, incluso si se sospecha de una enfermedad crónica o progresiva tal como PC o cáncer de páncreas, el método de la presente invención se debería realizar rápidamente después de la ocurrencia de los primeros síntomas, al menos en 72 horas, para ser capaz de excluir que el paciente esté padeciendo PA en lugar de las sospechosas enfermedades crónicas o progresivas.

Ya que los niveles de GP2a en muestras de pacientes con PA con duración de la enfermedad más allá del 10º día de la aparición de los síntomas de la enfermedad no son significativamente diferentes de aquellos en las muestras de pacientes que padecen enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas, lo más sorprendente era que los niveles de GP2a en las muestras de pacientes con PA hasta el 3º día de duración de la enfermedad, lo cual quiere decir dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de dichos síntomas, sean significativamente elevados en comparación con todos los grupos control que incluyen individuos sanos y pacientes que padezcan enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas, entre las que se incluyen, sin limitación, pancreatitis crónica, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

En el método *in vitro* de acuerdo con la presente invención, determinar una concentración de GP2a en dicha muestra que es mayor que la concentración de GP2a en una o más muestras de control, tal como en un grupo de individuos sanos, indica la presencia de PA y la ausencia de pancreatitis crónica y cáncer pancreático.

Era completamente sorprendente que el método serológico de la presente invención permita diferenciar entre PA y pancreatitis crónica y cáncer de páncreas en la fase temprana de la enfermedad en 72 horas a partir de la ocurrencia de los síntomas de la enfermedad, ya que los síntomas causados por estas enfermedades son muy similares y un diagnóstico diferencial por medios serológicos conocidos en la materia no era posible y por lo tanto se requería de técnicas de diagnóstico por imágenes. Considerando especialmente que la pancreatitis crónica y el cáncer de páncreas normalmente se metían dentro de una determinación diagnóstica única de PA y pancreatitis crónica y cáncer de páncreas basándose en niveles de GP2, es particularmente sorprendente que GP2a sea capaz de la diferenciación de estas enfermedades cuando se mide en un momento temprano.

En una realización preferida del método, se usa un valor umbral de GP2a mayor que 0,2 ng/ml.

Es una gran ventaja del método *in vitro* según la presente invención que la determinación de una concentración de GP2a en una muestra de un sujeto humano que presenta síntomas de PA permita el diagnóstico de la presencia de PA y la ausencia de otras enfermedades pancreáticas o enfermedad que afecta al páncreas, si la concentración de GP2a es mayor que 0,2 ng/ml. La comparación de la concentración de GP2a determinada a un valor de referencia es un criterio muy eficaz y fácil de usar para el diagnóstico y permite hacer rápida decisión según el resultado del método según la presente invención.

En otra realización preferida del método de determinación se usa un valor umbral de GP2a mayor que 0,7 ng/ml.

5 En otra realización preferida del método de determinación una concentración de GP2a mayor que un valor umbral en el intervalo de 0,2 a 1,0 ng/ml indica la presencia de PA y la ausencia de pancreatitis crónica y cáncer de páncreas, y opcionalmente uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

10 En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención la región umbral puede oscilar de un valor tal como 0,2 a 1,5 ng/ml, 0,3 a 1,3 ng/ml, 0,4 a 1,1 ng/ml, 0,5 a 0,9 ng/ml, 0,2 a 1,0 ng/ml, 0,3 a 1,0 ng/ml, 0,4 a 1,0 ng/ml, 0,5 a 1,0 ng/ml, 0,6 a 1,0 ng/ml, 0,7 a 1,0 ng/ml, 0,8 a 1,0 ng/ml, 0,9 a 1,0 ng/ml, 0,2 a 0,9 ng/ml, 0,2 a 0,8 ng/ml, 0,2 a 0,7 ng/ml, 0,2 a 0,6 ng/ml, 0,2 a 0,5 ng/ml, 0,2 a 0,4 ng/ml, o de 0,2 a 0,3 ng/ml.

15 En un aspecto la invención se refiere a un método para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), en el que la Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a) comprende o consiste en una proteína:

a) con una secuencia de aminoácidos según el SEQ ID NO 1 o 2,

20 b) una secuencia de aminoácidos truncada según el SEQ ID NO 1 o 2, faltando no más de 50 aminoácidos del extremo N y/o C de la secuencia, o

c) una secuencia de aminoácidos de más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más preferentemente más del 95 % de identidad de secuencia con a) o b).

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

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

En el contexto de la invención como se describe en el presente documento, el reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a,

40 - en el que GP2a preferentemente comprende o consiste en una proteína

a) con una secuencia de aminoácidos según el SEQ ID NO 1 o 2,

45 b) una secuencia de aminoácidos truncada según el SEQ ID NO 1 o 2, faltando no más de 50 aminoácidos del extremo N y/o C de la secuencia, o

c) una secuencia de aminoácidos de más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más preferentemente más del 95 % de identidad de secuencia con a) o b),

50 - sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b) preferentemente según el SEQ ID NO 3 o 4.

La invención se refiere al sorprendente e inesperado hallazgo de que diferentes isoformas de la proteína GP2, GP2a y GP2b, se regulan diferencialmente durante PA y que la detección de GP2a da como resultado mayor precisión diagnóstica en comparación con la detección de GP2b o GP2 total.

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

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

ejemplo, variantes más largas de las isoformas más cortas (SEQ ID NO 3 o 4) que comprenden 10, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de secuencia de GP2 más que la forma de longitud natural también pueden permitir resultados de diagnóstico eficaces, como se describe en el presente documento.

En un aspecto de la invención, dicho reactivo de afinidad es un anticuerpo monoclonal. Era beneficioso aislar un anticuerpo que fuese completamente específico a GP2a. Anticuerpos con tales propiedades eran completamente desconocidos en la técnica y se enseñó que la secuencia que diferencia GP2a y GP2b no contiene epítomos adecuados para generar anticuerpos específicos. Por lo tanto, era sorprendente que en una realización de la presente invención el reactivo de afinidad dirigido contra GP2a sea un anticuerpo monoclonal.

En una realización adicional de la presente invención, dicho anticuerpo se une específicamente a GP2a,

- en el que GP2a preferentemente comprende o consiste en una proteína

- a) con una secuencia de aminoácidos según el SEQ ID NO 1 o 2,
- b) una secuencia de aminoácidos truncada según el SEQ ID NO 1 o 2, faltando no más de 50 aminoácidos del extremo N y/o C de la secuencia, o
- c) una secuencia de aminoácidos de más del 80 %, más del 85 %, más del 90 % o más preferentemente más del 95 % de identidad de secuencia con a) o b),

- sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b), preferentemente según el SEQ ID NO 3 o 4, en tanto condiciones de muestra nativas como desnaturalizadas.

Fue completamente inesperado que fuese posible generar anticuerpo monoclonal que muestra alta afinidad de unión y especificidad a GP2a y no muestra ninguna reactividad cruzada con GP2b. Es sorprendente que la parte de GP2a que no está contenida en GP2b contenga epítomos que son capaces de generar anticuerpos monoclonales altamente específicos. Es una gran ventaja de esta realización de la presente invención que el anticuerpo monoclonal no solamente se une específicamente a GP2a pero no a GP2b bajo condiciones nativas, sino también bajo condiciones de muestra desnaturalizadas, lo cual permite más flexibilidad en el manejo del material muestra antes de la realización del método *in vitro* según la presente invención, cuando el manejo y el procesamiento de la muestra no requiere necesariamente que las moléculas en la muestra permanezcan en su estado nativo. Esto es importante para el proceso de preparación de muestra para el análisis con el método de la presente invención, en términos de condiciones de almacenamiento y condiciones tampón.

En una realización adicional el método como se describe en el presente documento se conduce como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en el que dicho reactivo de afinidad se inmoviliza sobre una superficie sólida antes de ponerse en contacto con dicha muestra. Es una gran ventaja del método según la presente invención que pueda llevarse a cabo como un ELISA, que es una técnica de laboratorio convencional y rutinaria que puede llevarse a cabo en casi todos los laboratorios de diagnóstico. Cuando el método se puede realizar como un ELISA, se pueden evitar procedimientos diagnósticos complicados tales como endoscopias o análisis por biopsia y de ese modo un mayor grupo diana de personas es capaz de ejecutar el método según la presente invención.

El nuevo ELISA contra GP2a según la presente invención es una herramienta de diagnóstico mejor para el diagnóstico diferencial de pacientes que presentan síntomas de PA para indicar la presencia de PA y la ausencia de otras enfermedades pancreáticas o enfermedades que afectan al páncreas y probada por ser superior en término de precisión diagnóstica y realización de ensayo en comparación con todos otros métodos serológicos disponibles para el diagnóstico de PA entre los que se incluye un ELISA contra GP2t. Otra ventaja del ELISA contra GP2a según la presente invención es que genera mayores razones de verosimilitud positivas y tiene una tasa mucho menor de resultados falsos positivos en comparación con un ELISA contra GP2t.

El ELISA contra GP2a según la presente invención muestra buena linealidad. Asimismo, El ELISA contra GP2a según la presente invención mostró excelentes coeficientes de variación intraensayo e interensayo haciéndolo un método *in vitro* fuerte y reproducible para el diagnóstico de PA. El ELISA contra GP2a según la presente invención tiene muy buena recuperación de GP2a de la GP2a presente en una muestra, demostrando que este método es una prueba diagnóstica fiable. Otra gran ventaja de la ELISA contra GP2a según la presente invención es la fuerza del método hacia la interferencia de la señal generada con otras moléculas presentes en la muestra. Hay que indicar que no se identificó molécula que interfiera significativamente con la señal generada por el método ELISA según la presente invención, haciéndolo un método *in vitro* fiable para el diagnóstico de PA.

En una realización el método de la presente invención se caracteriza porque la determinación de concentración de GP2a se lleva a cabo

- a) capturando GP2a de la muestra por el reactivo de afinidad de GP2a que se inmoviliza a la superficie sólida,
- b) tratando dicha GP2a capturada con un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2,
- c) detectando una señal emitida a partir de dicho reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2 y
- d) comparando la señal obtenida de dicho reactivo de afinidad secundario marcado con la señal de una o más

muestras de control de concentración de GP2a predeterminada.

Es una gran ventaja de esta realización de la presente invención que la concentración de GP2a en una muestra pueda llevarse a cabo comparando la señal emitida a partir del reactivo de afinidad secundario que ha capturado GP2a dentro de la muestra y la señal emitida a partir de dichos reactivos de afinidad secundarios de una o más muestras de concentración de GP2a predeterminada. Tales muestras de control pueden generarse fácilmente en el momento de llevar a cabo el método usando GP2a recombinante. Esto permite la determinación de la concentración de GP2a en un procedimiento de laboratorio rutinario que solamente requiere equipo de laboratorio convencional.

El hecho de que el reactivo de afinidad que es específico a la isoforma de GP2a se inmovilice permite la retirada de todos los otros componentes de muestra excepto GP2a de la superficie acoplada al reactivo de afinidad de GP2a lavando la superficie sólida después de capturar las moléculas de GP2a presentes en la muestra. Cuando no hay otra GP2 que GP2a presente sobre la superficie sólida después de lavar todos los otros componentes de la muestra, Es posible usar un reactivo de afinidad secundario que no es específico a GP2a pero justo tiene que ser capaz de reconocer cualquier reactivo de afinidad a GP2. Tales reactivos de afinidad se conocen en la técnica y son fácilmente disponibles, lo cual es una gran ventaja para hacer la presente invención muy disponible.

En una realización preferida de la presente invención, dicha señal se obtiene preferentemente a partir de peroxidasa de rábano picante conjugado con el reactivo de afinidad secundario. La peroxidasa de rábano picante (HRP) se usa en las aplicaciones bioquímicas principalmente por su capacidad para amplificar una señal débil e incrementar la detectabilidad de una molécula diana. Su presencia es ser hecha visible usando un sustrato que, cuando se oxida por HRP usando peróxido de hidrógeno como agente de oxidación, produce un cambio característico que es detectable por métodos espectrofotométricos. Se han descrito y comercializado numerosos sustratos para la enzima peroxidasa de rábano picante para explotar los rasgos deseables de HRP. La peroxidasa de rábano picante también se usa comúnmente en técnicas tales como ELISA e inmunohistoquímica debido a su naturaleza monomérica y la facilidad con la que produce productos coloreados. La peroxidasa de rábano picante es ideal en muchos aspectos para estas aplicaciones debido a que es menor, más estable, y menos cara que otras alternativas populares. También tiene una alta tasa de renovación que permite la generación de señales fuertes en un periodo de tiempo relativamente corto.

Las concentraciones de GP2a y GP2t y los límites para GP2a y GP2t divulgados en el presente documento se refieren preferentemente a las medidas del nivel proteico de GP2a y GP2t en una muestra de suero obtenida de un paciente por medio de las medidas de ELISA de GP2a y GP2t descritas en el presente documento. Preferentemente, las medidas de ELISA para determinar la concentración de GP2a y GP2t se llevaron a cabo como se describe en la sección EJEMPLOS de la presente memoria de patente.

Por consiguiente, los valores divulgados en el presente documento pueden variar en algún grado dependiendo del método de detección/medición empleado y los valores específicos divulgados en el presente documento se pretenden leer también sobre los correspondientes valores determinados mediante otros métodos o la modificación de los métodos divulgados en el presente documento.

De acuerdo con el método de la presente invención, la muestra es una muestra sanguínea, una muestra de plasma, o una muestra de suero. En el presente documento también se divulgan métodos que usan una muestra de saliva, una muestra de orina, una muestra de heces, una muestra de lágrimas, una muestra de jugos pancreáticos puros o jugos duodenales, una muestra tisular o un extracto celular. Preferentemente, la muestra es una muestra de suero.

En una realización la invención además comprende informar al paciente de los resultados del método diagnóstico descrito en el presente documento.

La invención además proporciona un kit para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- a) un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a y una superficie sólida para la inmovilización de dicho reactivo de afinidad, o un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a inmovilizado en una superficie sólida, en el que dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b)
- b) un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2 y medios para detectar la señal emitida a partir de dicho marcador, y
- c) programa informático configurado para determinar la concentración de GP2a capturada de una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenida del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de los síntomas de enfermedad pancreática por un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho programa informático además se configura para determinar la concentración de GP2a en dicha muestra usando un valor umbral de 0,7 ng/ml, en el que la determinación de una concentración de GP2a mayor que 0,7 ng/ml en dicha muestra indica la presencia de PA, y la ausencia de uno o más de pancreatitis crónica, y cáncer de páncreas, y opcionalmente la ausencia de uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

En el presente documento también se divulga un kit para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- 5 a) un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a y una superficie sólida para la inmovilización de dicho reactivo de afinidad, o un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a inmovilizado en una superficie sólida,
- b) un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2 y medios para detectar la señal emitida a partir de dicho marcador, y
- 10 c) programa informático configurado para determinar la concentración de GP2a capturada de una muestra por un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho programa informático además se configura para determinar si la concentración de GP2a en dicha muestra está por encima o por debajo de 0,7 ng/ml.

La combinación de todos los reactivos requeridos para la realización del método *in vitro* según la presente invención en un formato apropiado para llevar a cabo el método es motivada solamente por el nuevo y sorprendente hallazgo de la presente invención. La combinación de un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a y una superficie sólida para la inmovilización de dicho reactivo de afinidad, o un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a inmovilizada, un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido contra GP2 y medios para detectar la señal emitida a partir de dicho marcador, y programa informático configurado para determinar la concentración de GP2a capturada de una muestra por un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho programa informático además se configura para determinar si la concentración de GP2a en dicha muestra es mayor o no que la concentración media de GP2a en una o más muestras de control, tal como en un grupo de individuos sanos como tal por lo tanto debe considerarse un descubrimiento inesperado de la materia. No existe ninguna sugerencia en la bibliografía relevante de que se debería haber desarrollado la provisión de un kit que comprenda dichos componentes.

25 El programa informático según la realización preferida de la presente invención se ejecuta por un dispositivo de procesamiento por ordenador opcionalmente en red configurado para realizar instrucciones ejecutables para aplicar un modelo o algoritmo para analizar las señales generadas por los reactivos de afinidad secundarios marcados dirigidos contra GP2.

30 En otra realización preferida, el kit se caracteriza porque el programa informático comprende además un módulo de programa informático para designar un régimen de tratamiento para el individuo. Por consiguiente, es posible que el programa informático del kit no solamente proporcione un diagnóstico sobre el resultado del método llevado a cabo con la ayuda del kit, sino también proporciona la información con respecto al régimen de tratamiento que se debería administrar al paciente debido al resultado del método de la presente invención.

35 Los métodos de la presente invención pueden ser en parte implementados por ordenador. Por ejemplo, la etapa de comparación del nivel detectado de GP2a con un nivel de referencia se puede realizar en un sistema informático. En el sistema informático, el nivel determinado de la GP2a puede combinarse con otros niveles marcadores y/o parámetros del sujeto. En el sistema informático, el nivel determinado de la GP2a puede combinarse con otros niveles marcadores y/o parámetros del sujeto a fin de calcular una puntuación, que es indicativa para el diagnóstico, el pronóstico, la evaluación de riesgo y/o la estratificación de riesgo. Por ejemplo, los valores determinados pueden introducirse (o bien manualmente por un profesional sanitario o automáticamente desde el(los) dispositivo(s) en el(los) que el(los) respectivo(s) nivel(es) marcador(es) se ha(n) determinado) en el sistema informático. El sistema informático puede estar directamente en el lugar de atención (por ejemplo, atención primaria, unidad de cuidados intensivos o departamento de urgencias) o puede estar en una localización remota conectado por un ordenador en red (por ejemplo, por internet, o sistemas en nube médica especializada, opcionalmente combinable con otros sistemas IT o plataformas tales como sistemas de información hospitalario (HIS)). Normalmente, el sistema informático almacenará los valores (por ejemplo, el nivel de GP2a o parámetros tales como la edad, la presión sanguínea, el peso, el sexo, etc. o sistemas de puntuación clínica) sobre un medio legible por ordenador y calcular la puntuación basándose en los niveles predefinidos y/o prealmacenados o valores de referencia. La puntuación resultante se mostrará y/o imprimirá para el usuario (normalmente un profesional sanitario tal como un médico). Como alternativa o además, el pronóstico asociado, el diagnóstico, la evaluación, las directrices de tratamiento, las directrices de tratamiento del paciente o la estratificación se mostrarán y/o imprimirán para el usuario (normalmente un profesional sanitario tal como un médico).

55 En una realización de la invención, se puede emplear un sistema informático, en el que un algoritmo de aprendizaje de máquina es evidente, preferentemente para identificar pacientes hospitalizados que muestran síntomas de PA y o bien padecen pancreatitis aguda o no como se determina por el método de la presente invención usando datos de registros sanitarios electrónicos (EHR). Un enfoque de aprendizaje de máquina se puede entrenar sobre un clasificador de bosque aleatorio usando los datos de EHR (tales como laboratorios, expresión de biomarcador, vitales, y demográficos) de pacientes. El aprendizaje de máquina es un tipo de inteligencia artificial que proporciona ordenadores con la capacidad de aprender patrones complejos en los datos sin estar explícitamente programados, a diferencia de los sistemas basados en reglas. Estudios anteriores han usado datos de registro sanitario electrónico para desencadenar alertas para detectar deterioro clínico en general. En una realización de la invención el procesamiento de los niveles de GP2a se puede incorporar en el programa informático apropiado para la comparación de conjuntos de datos existentes, por ejemplo, los niveles de GP2a también se pueden procesar en el

programa informático de aprendizaje de máquina para ayudar en el diagnóstico de la pancreatitis aguda u otras enfermedades.

5 En una realización preferida el kit según la presente invención comprende un programa informático, el cual se configura para determinar si la concentración de GP2a en dicha muestra está por encima o por debajo de 0,7 ng/ml.

10 Se pretende que las realizaciones descritas en el presente documento en referencia al kit de la presente invención también se refieran a características estructurales de los componentes del método como se describe en el presente documento. Por lo tanto, las características del kit como se describe en el presente documento también pueden usarse para caracterizar el método, y viceversa.

El kit según la presente invención comprende un programa informático, el cual se configura para determinar la concentración de GP2a en dicha muestra usando un valor umbral de 0,7 ng/ml.

15 En el presente documento se divulga un kit que comprende un programa informático, el cual se configura para determinar la concentración de GP2a en dicha muestra usando una región umbral de 0,2 a 1,0 ng/ml, 0,3 a 1,0 ng/ml, 0,4 a 1,0 ng/ml, 0,5 a 1,0 ng/ml, 0,6 a 1,0 ng/ml, 0,7 a 1,0 ng/ml, 0,8 a 1,0 ng/ml, 0,9 a 1,0 ng/ml, 0,2 a 0,9 ng/ml, 0,2 a 0,8 ng/ml, 0,2 a 0,7 ng/ml, 0,2 a 0,6 ng/ml, 0,2 a 0,5 ng/ml, 0,2 a 0,4 ng/ml, o de 0,2 a 0,3 ng/ml.

20 La invención además proporciona un sistema para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- como componentes de un kit

25 a) un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a y una superficie sólida para la inmovilización de dicho reactivo de afinidad, o un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a inmovilizado en una superficie sólida, en el que dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b)

30 b) un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2 y medios para detectar la señal emitida a partir de dicho marcador, y

35 c) programa informático configurado para determinar la concentración de GP2a capturada de una muestra de sangre completa, plasma o suero obtenida del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de los síntomas de enfermedad pancreática por un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en el que dicho programa informático además se configura para determinar la concentración de GP2a en dicha muestra usando un valor umbral de 0,7 ng/ml, en el que la determinación de una concentración de GP2a mayor que 0,7 ng/ml en dicha muestra designa la presencia de PA, y la ausencia de pancreatitis crónica, y cáncer de páncreas, y opcionalmente la ausencia de uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis, y

40 - un sistema informático para análisis automatizado de una o más muestras, que comprende un dispositivo de procesamiento de ordenador y un lector de placa o cámara adecuados para detectar la señal del reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2.

45 La combinación de un kit según la presente invención con un sistema informático apropiado para llevar a cabo análisis automatizado de una o más muestras ha sido motivado solamente por el nuevo y sorprendente hallazgo de la presente invención. Por lo tanto, la combinación de los componentes del kit y el sistema informático debe considerarse un descubrimiento inesperado de la técnica. No existe ninguna sugerencia en la bibliografía relevante de que se debería haber desarrollado la provisión de un sistema que comprenda dichos componentes.

50 Es una gran ventaja del sistema informático para el análisis automatizado de una o más muestras que comprenda componentes que están disponibles en la mayoría de los laboratorios que llevan a cabo métodos *in vitro* de diagnóstico serológico. El experto en la materia conoce diferentes realizaciones de dispositivos de procesamiento de ordenador, lectores de placa y cámaras para detectar la señal del reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2.

55 La divulgación además comprende un tratamiento del sujeto después de determinar una concentración de GP2a en dicha muestra. Es particularmente ventajoso que la presente invención sea capaz del diagnóstico rápido de pancreatitis aguda en un paciente y la diferenciación de la pancreatitis aguda de otras enfermedades pancreáticas en tal periodo de tiempo corto después de la ocurrencia de los síntomas. Esto permite la iniciación de un tratamiento o un régimen de tratamiento tras la determinación de la concentración de GP2a en dicha muestra. El tratamiento puede ser específico a pancreatitis aguda y por lo tanto puede diferir de un régimen de tratamiento que se iniciaría en pacientes que padecen otras enfermedades pancreáticas tales como pancreatitis crónica o cáncer pancreático. El tratamiento o régimen de tratamiento puede ser sugerido o proporcionado por el sistema informático de la presente invención.

65 El tratamiento en el contexto de la presente invención comprende, sin limitación, reemplazo de líquido, control del

dolor, reposo digestivo, soporte nutricional, antibióticos, carbapenemos tales como imipenemo o meropenemo, pefloxacin, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP), cirugía tal como manejo mínimamente invasivo (necrosectomía a través de incisión pequeña en la piel (flanco izquierdo) o abdomen), manejo convencional (necrosectomía con drenaje simple), manejo cerrado (necrosectomía con lavado posoperatorio continuo cerrado) y manejo abierto (necrosectomía con reoperaciones programadas por fases en intervalos definidos (hasta 20+ reoperaciones en algunos casos)), inhibidores enzimáticos pancreáticos, octreotida y combinaciones de los mismos.

Descripción detallada de la invención

Tabla 1: Terminología de las isoformas de GP2. Las isoformas 1 y 2 pueden denominarse isoforma alfa.

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

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

SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos	Descripción
SEQ ID NO 1	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYG NPIEASSYGLDLDCGAPGTPEAHVCFDPCQNYTLL DEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGEAGVR MSETCVQVHRCQTDAPMWLNGTHPALGDGITNHT ACAHWSGNCCFWKTEVLVKACPGGYHVYRLEGTP WCNLRVCTVPRDPSTVEDKCEKACRPEEECLALN STWGCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKV DKCLLGGLGGLGEEVIAYLDPNCSSILQTEERNWW SVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIR DTILNINFQCAYP LDMKVSLQAALQPIVSSLNVSD GNGEFIVRMALFQDQNYTNPYEGDAVELSVESVLY VGAILEQGDTSRFLNVLRLNCYATPTEDKADLVKYFII RNSCSNQRDSTIHVEENGQSSESRSFSVQMFMFAG HYDLVFLHCEIHLCDLSNEQCQPSCSRSQVRSEVP AIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVA WPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (1) representa la transcripción más larga, aunque aparece con poca frecuencia. Codifica la proteína más larga (isoforma 1).
SEQ ID NO 2	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRGYG NPIEASSYGLDLDCGAPGTPEAHVCFDPCQNYTLL DEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGEAGVR MSETCVQVHRCQTDAPMWLNGTHPALGDGITNHT ACAHWSGNCCFWKTEVLVKACPGGYHVYRLEGTP WCNLRVCTDPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTW GCFCRQDLNSSDVHSLQPQLDCGPREIKVKVDKCL LGGLGGLGEEVIAYLDPNCSSILQTEERNWWSVTSP VQASACRNILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITLNI NFQCAYP LDMKVSLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFI VRMALFQDQNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILE QGDTSRFLNVLRLNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCS NQRDSTIHVEENGQSSESRSFSVQMFMFAGHYDLV	Variante de transcripción: Esta variante (2) carece de un segmento alternativo en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 2) es más corta que la isoforma 1. La isoforma 2 también se conoce como la forma alfa.

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos	Descripción
	FLHCEIHLCDLNEQCQPSCSRQVRSEVPAIDLAR VLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVAWPMV LLTVLLAWLF	
SEQ ID NO 3	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQVRPR DPSTVEDKCEKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDL NSSDVHSLQPQLDCGPRIKVKVDKCLLGGLGLGE EVIAYLRDPNCSSILQTEERNWWSVTSPVQASACR NILERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITILNINFQAYPL DMKVSLLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQ DQNYTNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRF NLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTI HVEENGQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHL CDLNEQCQPSCSRQVRSEVPAIDLARVLDLGPIT RRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVAWPMVLLTVLLAW LF	Variante de transcripción: Esta variante (3) carece de un segmento alternativo en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 3) tiene un extremo N más corto en comparación con la isoforma 1, aunque se mantienen los 31 aa más N terminales.
SEQ ID NO 4	MPHLMERMVGSGLLWLALVSCILTQASAVQRDPST VEDKCEKACRPEEECLALNSTWGCFCRQDLNSSD VHSLQPQLDCGPRIKVKVDKCLLGGLGLGEEVIAY LRDPNCSSILQTEERNWWSVTSPVQASACRNILER NQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITILNINFQAYPLDMKV SLQAALQPIVSSLNVSDGNGEFIVRMALFQDQNY TNPYEGDAVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLVLR NCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDSTIHVEEN GQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLNE EQCQPSCSRQVRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGA QSPGVMNGTPSTAGFLVAWPMVLLTVLLAWLF	Variante de transcripción: Esta variante (4) carece de dos segmentos alternativos en el marco, en comparación con la variante 1. La proteína resultante (isoforma 4) tiene un extremo N más corto en comparación con la isoforma 1, aunque se mantienen los 31 aa más N terminales. La isoforma 4 también se conoce como la forma beta.

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

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 5	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCT GGCCTCCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATT CTGACCCAGGCATCTGCAGTGCAGCGAGGTTAT GGAAACCCCATTTGAAGCCAGTTCGTATGGGCTG GACCTGGACTGCGGAGCTCCTGGCACCCAGAG GCTCATGTCTGTTTTGACCCCTGTCAGAATTACA CCCTCCTGGATGAACCCTTCCGAAGCACAGAGA ACTCAGCAGGGTCCCAGGGGTGCGATAAAAACA TGAGCGGCTGGTACCGCTTTGTAGGGGAAGGAG GAGTAAGGATGTCGGAGACCTGTGTCCAGGTGC ACCGATGCCAGACAGACGCTCCCATGTGGCTGA ATGGGACCCACCCTGCCCTTGGGGATGGCATCA	Isoforma 1 Base de datos de CCDS CCDS42128.1

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
	CCAACCACACTGCCTGTGCCCATTGGAGTGGCA ACTGCTGTTTCTGGAAAACAGAGGTGCTGGTGAA GGCCTGCCCAGGCGGGTACCATGTGTACCGGT GGAAGGCACTCCCTGGTGTAACTCTGAGATACTG CACAGTTCCACGAGACCCATCCACTGTGGAGGA CAAGTGTGAGAAGGCCTGCCGCCCCGAGGAGG AGTGCCTTGCCCTCAACAGCACCTGGGGCTGTT TCTGCAGACAGGACCTCAATAGTTCTGATGTCCA CAGTTTGCAGCCTCAGCTAGACTGTGGGCCCAG GGAGATCAAGGTGAAGGTGGACAAATGTTTGCT GGGAGGCCTGGGTTTGGGGGAGGAGGTCATTG CCTACCTGCGAGACCCAACTGCAGCAGCATCTT GCAGACAGAGGAGAGGAACTGGGTATCTGTGAC CAGCCCCGTCCAGGCTAGTGCCTGCAGGAACAT TCTGGAGAGAAATCAAACCCATGCCATCTACAAA AACACCCTCTCCTTGGTCAATGATTTTCATCATCA GAGACACCATCCTCAACATCAACTTCCAATGTGC CTACCCACTGGACATGAAAGTCAGCCTCCAAGCT GCCTTGCAGCCCATTGTAAGTTCCCTGAACGTCA GTGTGGACGGAATGGAGAGTTCATTGTCAGGA TGGCCCTCTTCCAAGACCAGAACTACACGAATCC TTACGAAGGGGATGCAGTTGAACTGTCTGTTGAG TCCGTGCTGTATGTGGGTGCCATCTTGGAACAAG GGGACACCTCCCGGTTTAACTGGTGTGAGGA ACTGCTATGCCACCCCCACTGAAGACAAGGCTG ACCTTGTGAAGTATTTTCATCATCAGAAACAGCTG CTCAAATCAACGTGATTCCACCATCCACGTGGAG GAGAATGGGCAGTCCTCGGAAAGCCGGTTCTCA GTTCAGATGTTTCATGTTTGCTGGACATTATGACC TAGTTTTCTGCATTGTGAGATTCATCTCTGTGAT TCTCTTAATGAACAGTGCCAGCCTTCTTGCTCAA GAAGTCAAGTCCGCAGTGAAGTACCGGCCATCG ACCTAGCCCGGGTTCTAGATTTGGGGCCCATCA CTCGGAGAGGTGCACAGTCTCCCGGTGTCATGA ATGGAACCCCTAGCACTGCAGGGTTCCTGGTGG CCTGGCCTATGGTCCTCCTGACTGTCCTCCTGG CTTGGCTGTTCTGA	

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 6	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCT GGCCTCCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATT CTGACCCAGGCATCTGCAGTGCAGCGAGGTTAT GGAAACCCCATTTGAAGCCAGTTCGTATGGGCTG GACCTGGACTGCGGAGCTCCTGGCACCCAGAG GCTCATGTCTGTTTTGACCCCTGTCAGAATTACA CCCTCCTGGATGAACCCTTCCGAAGCACAGAGA ACTCAGCAGGGTCCCAGGGGTGCGATAAAAACA TGAGCGGCTGGTACCGCTTTGTAGGGGAAGGAG	Isoforma 2 Base de datos de CCDS CCDS10582.2

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
	GAGTAAGGATGTCTGGAGACCTGTGTCCAGGTGC ACCGATGCCAGACAGACGCTCCCATGTGGCTGA ATGGGACCCACCCTGCCCTTGGGGATGGCATCA CCAACCACACTGCCTGTGCCCATTGGAGTGGCA ACTGCTGTTTCTGGAAAACAGAGGTGCTGGTGAA GGCCTGCCCAGGCGGGTACCATGTGTACCGGTT GGAAGGCACTCCCTGGTGTAACTGTGAGATACTG CACAGACCCATCCACTGTGGAGGACAAGTGTGA GAAGGCCTGCCGCCCCGAGGAGGAGTGCCTTG CCCTCAACAGCACCTGGGGCTGTTTCTGCAGAC AGGACCTCAATAGTTCTGATGTCCACAGTTTGCA GCCTCAGCTAGACTGTGGGCCCAGGGAGATCAA GGTGAAGGTGGACAAATGTTTGCTGGGAGGCCT GGGTTTGGGGGAGGAGGTCATTGCCTACCTGCG AGACCCAACTGCAGCAGCATCTTGCAGACAGA GGAGAGGAACTGGGTATCTGTGACCAGCCCCGT CCAGGCTAGTGCCTGCAGGAACATTCTGGAGAG AAATCAAACCCATGCCATCTACAAAAACACCCTC TCCTTGGTCAATGATTTTCATCATCAGAGACACCA TCCTCAACATCAACTTCCAATGTGCCTACCCACT GGACATGAAAGTCAGCCTCCAAGCTGCCTTGCA GCCCATTGTAAGTTCCCTGAACGTCAGTGTGGAC GGGAATGGAGAGTTCATTGTCAGGATGGCCCTC TTCCAAGACCAGAACTACACGAATCCTTACGAAG GGGATGCAGTTGAACTGTCTGTTGAGTCCGTGCT GTATGTGGGTGCCATCTTGAACAAGGGGACAC CTCCCGGTTTAACCTGGTGTGAGGAACTGCTAT GCCACCCCCACTGAAGACAAGGCTGACCTTGTG AAGTATTTTCATCATCAGAAACAGCTGCTCAAATCA ACGTGATTCCACCATCCACGTGGAGGAGAATGG GCAGTCCTCGGAAAGCCGGTTCTCAGTTCAGAT GTTTCATGTTTGCTGGACATTATGACCTAGTTTTCC TGCATTGTGAGATTCATCTCTGTGATTCTCTTAAT GAACAGTGCCAGCCTTCTTGCTCAAGAAGTCAAG TCCGCAGTGAAGTACCGGCCATCGACCTAGCCC GGGTTCTAGATTTGGGGCCCATCACTCGGAGAG GTGCACAGTCTCCCGGTGTCATGAATGGAACCC CTAGCACTGCAGGGTTCCTGGTGGCCTGGCCTA TGGTCCTCCTGACTGTCCTCCTGGCTTGGCTGTT CTGA	

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 7	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCT GGCCTCCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATT CTGACCCAGGCATCTGCAGTGCAGCGAGTTCCA CGAGACCCATCCACTGTGGAGGACAAGTGTGAG AAGGCCTGCCGCCCCGAGGAGGAGTGCCTTGC CCTCAACAGCACCTGGGGCTGTTTCTGCAGACA	Isoforma 3 Base de datos de CCDS CCDS45433.1
	GGACCTCAATAGTTCTGATGTCCACAGTTTGCAG CCTCAGCTAGACTGTGGGCCAGGGAGATCAAG GTGAAGGTGGACAAATGTTTGCTGGGAGGCCTG GGTTTGGGGGAGGAGGTCATTGCCTACCTGCGA GACCCAACTGCAGCAGCATCTTGCAGACAGAG GAGAGGAACTGGGTATCTGTGACCAGCCCCGTC CAGGCTAGTGCCTGCAGGAACATTCTGGAGAGA AATCAAACCCATGCCATCTACAAAAACACCCTCT CCTTGGTCAATGATTTTCATCATCAGAGACACCAT CCTCAACATCAACTTCCAATGTGCCTACCCACTG GACATGAAAGTCAGCCTCCAAGCTGCCTTGCAG CCCATTGTAAGTTCCCTGAACGTCAGTGTGGACG GGAATGGAGAGTTCATTGTCAGGATGGCCCTCTT CCAAGACCAGAACTACACGAATCCTTACGAAGG GGATGCAGTTGAACTGTCTGTTGAGTCCGTGCTG TATGTGGGTGCCATCTTGAACAAGGGGACACC TCCCGGTTTAACCTGGTGTGAGGAACTGCTATG CCACCCCCACTGAAGACAAGGCTGACCTTGTGA AGTATTTTCATCATCAGAAACAGCTGCTCAAATCAA CGTGATTCCACCATCCACGTGGAGGAGAATGGG CAGTCCTCGGAAAGCCGGTTCTCAGTTCAGATGT TCATGTTTGCTGGACATTATGACCTAGTTTTCTG CATTGTGAGATTCATCTCTGTGATTCTCTTAATGA ACAGTGCCAGCCTTCTTGCTCAAGAAGTCAAGTC CGCAGTGAAGTACCGGCCATCGACCTAGCCCGG GTTCTAGATTTGGGGCCCATCACTCGGAGAGGT GCACAGTCTCCCGGTGTCATGAATGGAACCCCT AGCACTGCAGGGTTCCTGGTGGCCTGGCCTATG GTCCTCCTGACTGTCCTCCTGGCTTGGCTGTTCT GA	

(continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de nucleótidos	Descripción
SEQ ID NO 8	ATGCCTCACCTTATGGAAAGGATGGTGGGCTCT GGCCTCCTGTGGCTGGCCTTGGTCTCCTGCATT CTGACCCAGGCATCTGCAGTGCAGCGAGACCCA TCCACTGTGGAGGACAAGTGTGAGAAGGCCTGC CGCCCCGAGGAGGAGTGCCTTGCCCTCAACAGC ACCTGGGGCTGTTTCTGCAGACAGGACCTCAATA GTTCTGATGTCCACAGTTTGCAGCCTCAGCTAGA CTGTGGGCCCAGGGAGATCAAGGTGAAGGTGGA CAAATGTTTGCTGGGAGGCCTGGGTTTGGGGGA GGAGGTCATTGCCTACCTGCGAGACCCAACTG CAGCAGCATCTTGCAGACAGAGGAGAGGAACTG GGTATCTGTGACCAGCCCCGTCCAGGCTAGTGC CTGCAGGAACATTCTGGAGAGAAATCAAACCCAT GCCATCTACAAAACACCCTCTCCTTGGTCAATG ATTCATCATCAGAGACACCATCCTCAACATCAA CTTCCAATGTGCCTACCCACTGGACATGAAAGTC	Isoforma 4 Base de datos de CCDS CCDS45432.1
	AGCCTCCAAGCTGCCTTGCAGCCCATTGTAAGTT CCCTGAACGTCAGTGTGGACGGGAATGGAGAGT TCATTGTCAGGATGGCCCTCTTCCAAGACCAGAA CTACACGAATCCTTACGAAGGGGATGCAGTTGAA CTGTCTGTTGAGTCCGTGCTGTATGTGGGTGCCA TCTTGGAACAAGGGGACACCTCCCGGTTTAACCT GGTGTTGAGGAACTGCTATGCCACCCCCACTGA AGACAAGGCTGACCTTGTGAAGTATTCATCATC AGAAACAGCTGCTCAAATCAACGTGATTCCACCA TCCACGTGGAGGAGAATGGGCAGTCCCTCGGAAA GCCGGTTCTCAGTTCAGATGTTTCATGTTTGCTGG ACATTATGACCTAGTTTTCTGCATTGTGAGATTG ATCTCTGTGATTCTCTTAATGAACAGTGCCAGCC TTCTTGCTCAAGAAGTCAAGTCCGCAGTGAAGTA CCGGCCATCGACCTAGCCCGGGTTCTAGATTG GGGCCCATCACTCGGAGAGGTGCACAGTCTCCC GGTGTCATGAATGGAACCCCTAGCACTGCAGGG TTCCTGGTGGCCTGGCCTATGGTCCTCCTGACT GTCCTCCTGGCTTGGCTGTTCTGA	

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

5

La expresión "método *in vitro*" se refiere a un método que se realiza sobre una muestra, por ejemplo, sin limitación, un tejido, o un líquido corporal, fuera de su contexto biológico normal.

10

El término "muestra" incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo. Entre las muestras adecuadas para utilizar en la presente invención se incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, heces, lágrimas, cualquier otro fluido corporal, jugos pancreáticos puros o jugos duodenales, muestras tisulares (p. ej., biopsia) y extractos celulares de los mismos (p. ej., extracto de glóbulos rojos). En una realización preferida, la muestra es una muestra de suero. El uso de muestras tales como suero, saliva y orina es bien conocida en la

técnica (véase, por ejemplo, Hashida et al., *J. Clin. Lab. Anal.*, 11:267-86 (1997)). Un experto en la materia apreciará que muestras tales como muestras de suero se pueden diluir antes del análisis.

El término "individuo", "sujeto", o "paciente" se refiere normalmente a seres humanos, pero también a otros animales entre los que se incluyen, por ejemplo, otros primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" incluye una secuencia de aminoácidos que es similar, pero no idéntica a, la secuencia de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, es decir, polipéptido, que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que las isoformas de GP2 en los SEQ ID NO 1 a 4 y puede tener una o más modificaciones, tales como adiciones de aminoácidos, deleciones, o sustituciones relativas a la secuencia de aminoácidos de las isoformas de GP2, siempre que el polipéptido modificado conserve sustancialmente al menos una actividad biológica de GP2 tal como inmunorreactividad, en particular la reactividad inmunitaria específica a las enfermedades que pueden diagnosticarse según la presente invención. Una modificación particularmente útil de un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, es una modificación que confiere, por ejemplo, mayor estabilidad o reactividad. La incorporación de uno o más D-aminoácidos es una modificación útil para aumentar la estabilidad de un polipéptido o fragmento polipeptídico. De manera similar, la delección o sustitución de restos de lisina puede aumentar la estabilidad al proteger el polipéptido o fragmento polipeptídico contra la degradación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "isoforma de GP2" incluye una proteína que tiene al menos aproximadamente 50 % de identidad de aminoácidos con una o más de los SEQ ID NO 1 a 4. Como ejemplo no limitante, una isoforma de GP2 de la invención puede tener al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una o más de los SEQ ID NO 1 a 4. También se incluyen en el presente documento variantes de ácido nucleico de los SEQ ID NO 5 a 8 que codifican una secuencia proteica de los SEQ ID NO 1 a 4, o una secuencia sustancialmente con la misma secuencia de aminoácidos. También se incluye la secuencia de ácido nucleico complementaria, ya que es una secuencia degenerada modificada para usar la naturaleza degenerada del código genético, como conoce un experto en la materia.

Las secuencias de aminoácidos también pueden comprender de 0 a 100, de 2 a 50, de 5 a 20 o, por ejemplo, de 8 a 15, o cualquier valor de 0 a 20, adiciones o supresiones de aminoácidos en el extremo N y/o C de las proteínas. Los extremos también pueden modificarse con secuencias conectoras adicionales, o eliminación de secuencias, siempre que las propiedades de unión a anticuerpos y la inmunorreactividad de la proteína se mantengan esencialmente y los anticuerpos como se describen en el presente documento se unan de manera análoga con la secuencia específica proporcionada.

Se han desvelado en la técnica anterior diversas formas de preparar péptidos funcionalmente análogos. En la enseñanza según la invención se incluyen péptidos diseñados a partir de los péptidos de la invención usando dichos métodos. Por ejemplo, una forma de generar péptidos funcionalmente análogos se ha descrito en PNAS USA 1998, 13 de octubre, 9521, 12179-84; documentos WO 99/6293 y/o WO 02/38592; las enseñanzas anteriores se incorporan por la presente en la divulgación de la invención. Es decir, todos los péptidos, fragmentos peptídicos o estructuras que comprenden péptidos generados usando los métodos mencionados anteriormente, a partir de los péptidos de la invención, son péptidos según la invención, siempre que cumplan el objetivo de la invención y, en particular, interactúen con los anticuerpos específicos.

Reactivos de afinidad, tales como anticuerpos, dirigidos contra isoformas GP2 o proteínas GP2 con sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, por lo tanto, se pueden emplear en la presente invención a fin de detectar GP2a.

Las isoformas de GP2 también se pueden describir como antígenos, ya que reaccionan con un anticuerpo dirigido a dicha proteína isoforma de GP2. Las isoformas de GP2 también pueden denominarse proteínas o dianas.

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

El análisis descrito en el presente documento de determinación de la concentración de GP2 por unión de anticuerpo a una o más isoformas de GP2 es un método preferido de la presente invención. Para esta realización, la cantidad

de anticuerpos específicos a ciertas isoformas de GP2 proporcionadas para el experimento se debería controlar cuidadosamente para permitir el análisis comparativo directo. Como alternativa, o en combinación, se pueden usar valores o patrones control que proporcionen muestras con isoformas de GP2 o representen cantidades control de las mismas, como ya se ha obtenido de pruebas analíticas anteriores. Es posible usar valores control que han sido generados por el estudio de cohortes u otros grandes números de sujetos que padecen cualquier enfermedad dada o grupo de control. Los expertos en la materia conocen medios estadísticos adecuados para el análisis y la comparación de dichos conjuntos de datos. Se pueden usar muestras de control para controles positivos (tales como enfermos) o controles negativos (de sujetos sanos) para valores de referencia en comparación simultánea o no simultánea.

La expresión "enfermedades pancreáticas" se refiere a enfermedades del páncreas, entre las que se incluyen, sin limitación, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, diabetes mellitus (tipo 1 y tipo 2), insuficiencia pancreática exocrina, fibrosis quística, pseudocistitis pancreática, quistes del páncreas, malformaciones congénitas del páncreas, páncreas dividido, páncreas anular, tumores pancreáticos (benignos y malignos), cáncer de páncreas, cistadenoma seroso del páncreas, neoplasia pseudopapilar sólida, hemossuccus pancreaticus.

Enfermedades que afectan al páncreas incluyen todos los tipos de enfermedades que afectan al páncreas y causan síntomas similares a los síntomas de las enfermedades pancreáticas. Enfermedades que afectan al páncreas, incluyen, sin limitación, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica, peritonitis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, gastritis.

En una realización el ensayo descrito en el presente documento es capaz de diferenciar pancreatitis aguda de otras enfermedades pancreáticas.

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

La "pancreatitis crónica" es una inflamación de larga duración del páncreas que altera la estructura y las funciones normales del órgano. Se puede presentar como episodios de inflamación aguda en un páncreas previamente dañado, o como daño crónico con dolor persistente o mala absorción. Es un proceso de enfermedad caracterizado por daño irreversible al páncreas distinto de los cambios reversibles en la pancreatitis aguda.

"Síntomas de PA" son esencialmente los mismos que los síntomas de otra enfermedad pancreática e incluyen, sin limitación, dolor abdominal superior, dolor abdominal que se irradia a la espalda, dolor abdominal que se siente peor después de comer, náuseas, vómitos, dolor cuando se toca el abdomen, dolor abdominal superior, pérdida de peso sin pretenderlo, heces grasas y olorosas (esteatorrea). Dichos síntomas son bien conocidos por los facultativos expertos en el campo.

La expresión "reactivo de afinidad" en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, o cualquier otra molécula que específicamente se una a una molécula diana a fin de identificar, seguir, capturar, o influenciar en su actividad. El término "capturar" se refiere a la unión de una molécula diana por un reactivo de afinidad.

La expresión "reactivo de afinidad secundario" se refiere a cualquier reactivo de afinidad según la definición anterior, que se usa para unirse a un antígeno que ya está unido por otro reactivo de afinidad.

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

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a anticuerpos que son producidos por células inmunitarias idénticas que son todos los clones de una célula madre única, a diferencia de los anticuerpos policlonales, los cuales se producen a partir de varias células inmunitarias diferentes. Los anticuerpos monoclonales pueden tener afinidad

monovalente, es decir se unen al mismo epítipo (la parte de un antígeno que se reconoce por el anticuerpo). También existen anticuerpos monoclonales biespecíficos modificados genéticamente, donde cada "brazo" del anticuerpo es específico para un epítipo diferente. Dada casi cualquier sustancia, es posible producir anticuerpos monoclonales que específicamente se unen a esa sustancia; entonces pueden servir para detectar o purificar esa sustancia.

En otra realización ventajosa se usa un inmunoensayo en la detección de GP2a para lo cual se prevé la unión final del anticuerpo específico a GP2a a una fase sólida. Después de la adición de solución de muestra, la GP2a del paciente incluida en la misma se une al anticuerpo de GP2a. GP2a, la cual se obtiene, por ejemplo, del suero o heces de un paciente y se une al anticuerpo de GP2a, posteriormente se detecta usando un marcador, o reactivo marcado y opcionalmente se cuantifica.

Por tanto, de acuerdo con la invención, se efectúa detección de la GP2a en este método usando reactivos marcados según la tecnología de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) bien conocida. Por lo tanto, los marcadores según la invención comprenden enzimas que catalizan una reacción química que puede determinarse por medios ópticos, especialmente por medio de sustratos cromógenos, métodos quimioluminiscentes o colorantes fluorescentes. En otra realización preferida, la GP2a se detecta marcando con sustancias débilmente radioactivas en radioinmunoensayos (RIA) en donde se mide la radioactividad resultante.

Como ejemplos de medios para detectar el marcador en el método de la presente invención, diversas técnicas de inmunoensayo, entre las que se incluyen los inmunoensayos competitivos y no competitivos, se pueden usar para determinar la presencia o el nivel de uno o más marcadores en una muestra (véase, por ejemplo, Self et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:60-65 (1996)). El término inmunoensayo abarca técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ELISA de captura de antígenos, ELISA tipo sándwich, ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA); pruebas de flujo lateral; y ensayos de quimioluminiscencia (CL).

En otra realización preferida del método según la invención, GP2a se detecta en una prueba de flujo lateral, el cual también puede denominarse prueba inmunocromatográfica o prueba inmunocromatográfica de flujo lateral. Las pruebas de flujo lateral preferentemente se basan en una serie de lechos capilares, tales como, por ejemplo, piezas de papel poroso, polímero microestructurado, o polímero sinterizado. Cada uno de estos elementos tiene la capacidad de transportar líquido espontáneamente. El primer elemento (la almohadilla de muestra) actúa como una esponja y retiene un exceso de líquido de muestra. Una vez empapado, el líquido migra al segundo elemento (almohadilla de conjugado) en el que el fabricante ha almacenado el llamado conjugado, un formato seco de partículas bioactivas (véase más abajo) en una matriz de sal y azúcar que contiene todo para garantizar una reacción química optimizada entre la molécula diana (por ejemplo, un antígeno) y su compañero químico (por ejemplo, anticuerpo) que se ha inmovilizado en la superficie de la partícula. Mientras que el líquido de la muestra disuelve la matriz de sal y azúcar, también disuelve las partículas y en una acción de transporte combinada, la muestra y la mezcla conjugada fluyen a través de la estructura porosa. De esta manera, el analito se une a las partículas mientras migra más a través del tercer lecho capilar. Este material tiene una o más áreas (a menudo llamadas bandas) donde el fabricante ha inmovilizado una tercera molécula. Para cuando la mezcla muestra-conjugado alcanza estas bandas, el analito se ha unido a la partícula y la tercera molécula de "captura" se une al complejo. Después de un tiempo, cuando más y más líquido ha pasado por las bandas, las partículas se acumulan y el área de bandas cambia de color. Normalmente, hay al menos dos bandas: una (el control) que captura cualquier partícula y, por lo tanto, muestra que las condiciones de reacción y la tecnología funcionaron bien, la segunda contiene una molécula de captura específica y solo captura aquellas partículas en las que se ha inmovilizado una molécula de analito. Después de pasar estas zonas de reacción, el líquido ingresa en el material poroso final, la tira que simplemente actúa como un recipiente de desechos. Las pruebas de flujo lateral pueden funcionar como ensayos competitivos o tipo sándwich y en un principio se pueden realizar usando cualquier partícula de color. Sin embargo, el látex (color azul) o las partículas de oro de tamaño nanométrico (color rojo) se usan más comúnmente. Las partículas de oro son de color rojo debido a la resonancia de plasmón superficial localizada. También se pueden utilizar partículas fluorescentes o magnéticas marcadas, sin embargo, estas requieren el uso de un lector electrónico para evaluar el resultado de la prueba.

Si se desea, dichos inmunoensayos pueden automatizarse. También se pueden usar inmunoensayos junto con fluorescencia inducida por láser (véase, por ejemplo, Schmalzing et al., *Electrophoresis*, 18:2184-2193 (1997); Bao, J. *Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 699:463-480 (1997)). Los inmunoensayos de liposomas, tales como inmunoensayos de liposomas por inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, también son adecuados para su uso en la presente invención (véase, por ejemplo, Rongen et al., *J. Immunol. Methods*, 204:105-133 (1997)). Además, los ensayos de nefelometría, en los que la formación de complejos de proteína/anticuerpo da como resultado aumento de la dispersión de la luz que se convierte en una señal de velocidad máxima en función de la concentración del marcador, son adecuados para su uso en la presente invención. Los ensayos de nefelometría están disponibles en el mercado de Beckman Coulter (Brea, Calif.; kit n.º 449430) y se pueden realizar usando un analizador de nefelómetro Behring (Fink et al., *J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem.*, 27:261-276 (1989)).

En otra realización preferida del método según la invención, la GP2a se detecta en un inmunoensayo, preferentemente con acoplamiento directo o indirecto de un reactivo a una sustancia marcadora. Esto permite adaptación flexible del método a los potenciales y requisitos de diferentes laboratorios y sus equipos de diagnóstico de laboratorio. En una realización ventajosa, GP2a se detecta en un inmunoensayo en el que GP2a está presente disuelta en una fase líquida, preferentemente diluida en una solución de tampón convencional bien conocida por los expertos en la materia o en un fluido corporal sin diluir. De acuerdo con la invención, también se puede efectuar detección utilizando muestras de heces.

En otra realización preferida de la invención, anticuerpos solubles o unidos a fase sólida se usan para unirse a isoformas específicas de GP2. En una segunda etapa de reacción, se emplean reactivos de afinidad anti-GP2 secundarios, preferentemente anticuerpos anti-GP2 secundarios, los cuales son conjugados marcados de manera detectable de dos componentes que se pueden conjugar con cualquier enzima marcadora convencional, especialmente sustratos cromógenos y/o quimioluminiscentes, preferentemente con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina. La ventaja de esta realización radica en el uso de tecnología de ELISA disponible habitualmente en instalaciones de laboratorio de modo que pueda establecerse detección según la invención de manera rentable. En otra realización preferida de la invención los reactivos de afinidad anti-GP2 secundarios se acoplan de manera detectable a isotiocianato de fluoresceína (FITC). De manera similar al ELISA mencionado anteriormente, la tecnología de FITC representa un sistema que está disponible en muchos lugares y, por lo tanto, permite el establecimiento sin problemas y de bajo coste de la detección de la invención en la rutina de laboratorio.

la expresión "condiciones de muestra desnaturalizadas" se refiere a condiciones, que inducen la desnaturalización de las moléculas contenidas en una muestra. La desnaturalización es un proceso en el que las proteínas y los ácidos nucleicos pierden la estructura cuaternaria, la estructura terciaria y la estructura secundaria, que está presente en su forma nativa, mediante la aplicación de alguna fuerza externa o compuesto tal como un ácido o base fuerte, una sal inorgánica concentrada, un disolvente orgánico (por ejemplo, alcohol o cloroformo), radiación o calor.

La expresión "diagnóstico serológico" se refiere a pruebas diagnósticas o métodos, los cuales examinan el suero, los fluidos corporales u otras muestras biológicas para la presencia de determinados componentes a través del examen de laboratorio de reacciones de antígeno-anticuerpo en el suero. Las técnicas serológicas usadas para el análisis incluyen, sin limitación, ELISA, aglutinación, precipitación, fijación complementaria, y anticuerpos fluorescentes.

Un "kit para diagnóstico" incluye todos los reactivos específicos a analito necesarios requeridos para llevar a cabo una prueba diagnóstica. También pueden contener instrucciones o cómo conducir la prueba usando los reactivos proporcionados.

La unión inmunológica específica de un reactivo de afinidad tal como un anticuerpo al marcador de interés se puede detectar directa o indirectamente por un marcador que está emitiendo una señal. Cualquier medio dado para detectar estos marcadores puede considerarse un medio para detectar el marcador según el método de la invención. Los marcadores directos incluyen etiquetas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y similares, unidos al anticuerpo. Se puede usar un anticuerpo marcado con yodo-125 (125I) para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Un ensayo de quimioluminiscencia que usa un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador es adecuado para la detección no radioactiva, sensible de niveles de marcador. Un anticuerpo marcado con fluorocromo también es adecuado para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, Texas red y lisamina. Se pueden obtener en el mercado anticuerpos secundarios ligados a fluorocromos, por ejemplo, F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana-FITC está disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, Calif.).

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

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para la determinación de la concentración de moléculas específicas de interés en una muestra. Por ejemplo, la concentración de la molécula de interés, por ejemplo, una isoforma específica de GP2, en una muestra se determina comparando la señal generada por un reactivo de afinidad secundario según la presente invención que ha capturado la molécula de interés en dicha muestra a la señal generada por un reactivo de afinidad secundario que ha capturado la molécula de interés en una muestra de control, en donde se conoce la concentración de la molécula de interés en dicha muestra de control.

El método como se describe en el presente documento también se puede describir en términos de determinación de

la cantidad de GP2, como descripción alternativa o complementaria para la determinación de la concentración de GP2.

"Lectores de placa", también conocidos como lectores de microplaca o fotómetros de microplaca, son instrumentos que se usan para detectar sucesos biológicos, químicos o físicos de muestras en placas de microtitulación. Son ampliamente utilizados en investigación, descubrimiento de fármacos, validación de bioensayos, control de calidad y procesos de fabricación en la industria farmacéutica y biotecnológica y organizaciones académicas. Las reacciones de la muestra se pueden ensayar, por ejemplo, sin limitación, en placas de microtitulación de formato de 6-1536 pocillos. Los modos de detección comunes para los ensayos de microplaca son, por ejemplo, sin limitación, absorbancia, intensidad de fluorescencia, luminiscencia, fluorescencia con resolución temporal, y polarización de fluorescencia.

Una "cámara" en el contexto de la presente invención es un dispositivo disponible para la detección de la señal del reactivo de afinidad secundario marcado dirigido contra GP2. La cámara se puede proporcionar como comprendida en el lector de placa o individualmente. Los expertos en la materia están familiarizados con dichos dispositivos, los cuales se seleccionan basándose en el marcador del reactivo de afinidad secundario.

Se puede analizar una señal del marcador directo o indirecto, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromógeno; un contador de radiación para detectar radiación tal como un contador gamma para la detección de 1251; o un fluorómetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una longitud de onda determinada. Para la detección de anticuerpos ligados a enzimas, se puede realizar un análisis cuantitativo de la cantidad de niveles de marcador usando un espectrofotómetro tal como un lector de microplaca EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención se pueden automatizar o realizar de manera robótica, y se puede detectar la señal de múltiples muestras simultáneamente.

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

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

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

En otra realización preferida de la invención se inmovilizan los reactivos de afinidad según la presente memoria. Más específicamente, el anti-GP2 unido a fase sólida, preferentemente anti-GP2a, el anticuerpo dirigido a una molécula GP2 de acuerdo con una o más de las secuencias desveladas en el presente documento está unido a polímeros orgánicos, polímeros inorgánicos, sintéticos y/o mezclados, preferentemente agarosa, celulosa, gel de sílice, poliamidas y/o alcoholes polivinílicos. En el sentido de la invención, se entiende que la inmovilización implica diversos métodos y técnicas para fijar los péptidos en vehículos específicos, p. ej., según los documentos WO 99/56126 o WO 02/26292. Por ejemplo, la inmovilización puede servir para estabilizar los péptidos de modo que su actividad no se reduciría o modificaría de manera adversa por exposición biológica, química o física, especialmente durante el almacenamiento o en uso de un solo lote. La inmovilización de los péptidos permite el uso repetido en condiciones técnicas o clínicas rutinarias; asimismo, una muestra, preferentemente componentes sanguíneos, puede hacerse reaccionar con al menos uno de los péptidos según la invención de manera continua. En particular, esto se puede lograr mediante diversas técnicas de inmovilización, produciéndose la unión de los péptidos con otros péptidos o moléculas o con un vehículo de tal manera que la estructura tridimensional, en particular en el centro activo que media en la interacción con los compañeros de unión, de las moléculas correspondientes, especialmente de dichos péptidos, no cambiaría. Ventajosamente, no hay pérdida de especificidad a los anticuerpos GP2a como resultado de dicha inmovilización. En el sentido de la invención, se pueden usar tres métodos básicos para inmovilización:

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

(ii) Unión con un vehículo: la unión con un vehículo se produce mediante adsorción, unión iónica o unión covalente, por ejemplo. Dicha unión también puede tener lugar dentro de células microbianas o liposomas u otras estructuras membranosas, cerradas o abiertas. Ventajosamente, los péptidos no se ven afectados de manera adversa por dicha fijación. Por ejemplo, es posible el uso múltiple o continuo de péptidos unidos a vehículos con ventaja en el diagnóstico clínico o la terapia.

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

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

La invención también se refiere a un kit de diagnóstico. El equipo de diagnóstico incluye opcionalmente instrucciones acerca de la combinación de los contenidos del kit para la detección de PA y la diferenciación de otras enfermedades. Por ejemplo, la instrucción puede estar en forma de un folleto de instrucciones u otro medio que proporcione al usuario información acerca del tipo de método en el que se van a usar las sustancias mencionadas. Evidentemente, la información no necesariamente tiene que estar en forma de un folleto de instrucciones, y la información también se puede transmitir a través de Internet, por ejemplo.

Figuras

La invención se describe además por las siguientes figuras. Estas no pretenden limitar el alcance de la invención, sino representar realizaciones preferidas de aspectos de la invención proporcionados para mayor ilustración de la invención descrita en el presente documento. La invención se explicará ahora con más detalle en referencia a las figuras.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Análisis ELISA en fase sólida del reconocimiento de las isoformas recombinantes solubles de GP2 (GP2a y GP2b) en su estado nativo (A) y desnaturalizado (B) usando diferentes anticuerpos monoclonales, los cuales se han generado contra GP2. Los respectivos anticuerpos monoclonales se usaron como anticuerpos inmovilizados en fase sólida en ELISA.

Figura 2: Correlación de la glicoproteína 2 isoforma a (GP2a) y GP2 total (GP2t). Se detectaron los niveles de GP2a y GP2t en suero en 153 pacientes con pancreatitis aguda (PA) y 752 controles por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. La ecuación de regresión de todas las 905 muestras fue $y = -0,05x + 0,41x$, coeficiente de determinación (R^2) 0,49. A diferencia de los controles ($y = 0,02 + 0,27x$), se determinó (0,72 vs 0,29) para los 153 pacientes con PA ($y = -0,16 + 0,58x$) un R^2 mayor.

Figura 3: Correlación de los niveles de glicoproteína 2 isoforma a (GP2a) y GP2 total (GP2t) con la duración de la enfermedad. Se detectaron las GP2a y GP2t en suero en pacientes con pancreatitis aguda (PA) con diferente gravedad de enfermedad por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

I, PA leve; II, PA grave con complicaciones locales; III, PA grave con complicaciones sistémicas; IV, PA grave con resultado letal

Figura 4: Niveles de glicoproteína 2 isoforma a (GP2a) (A) y GP2 total (GP2t) (B) en suero en pacientes con pancreatitis aguda (PA) y controles. Se analizaron GP2a y GP2t en 153 pacientes con PA, 651 controles de enfermedad, 101 donantes de sangre (DS) por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los pacientes con PA se estratificaron en pacientes PA con hasta tres días de duración de la enfermedad (n = 12), entre 4 y 10 días (n = 47), y más de 10 días (n = 94). Como controles de enfermedad, 26 pacientes con pancreatitis crónica (PC), 125 con cáncer de páncreas, 118 con cáncer de hígado (CH), 126 con cáncer gastrointestinal (CGI), 40 con tumor neuroendocrino (TNE), 40 con sarcoma (SA), 109 con y enfermedades de hígado y biliares benignas (bL/BD), 27 con úlcera péptica (UP), y 40 con peritonitis (PT) investigada. (Los límites optimizados para GP2a y GP2t obtenidos por análisis de la curva de eficacia diagnóstica se ilustraron por líneas horizontales discontinuas. Los datos se presentan en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el rango intercuartílico, o mayores que el cuartil superior más 3 veces el rango intercuartílico, presentados como triángulos sólidos). P, prueba de Kruskal Wallis, análisis post hoc

Figura 5: Comparación de la precisión del ensayo de detección de glicoproteína 2 isoforma a (GP2a) y GP2 total (GP2t) por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. GP2a y GP2t se analizaron en 12 pacientes con pancreatitis aguda como criterios de enfermedad y 752 controles como criterios de no enfermedad para análisis de la curva de eficacia diagnóstica. Los niveles límites óptimos para GP2a y GP2t se determinaron a 0,7 y 2,3 ng/ml, respectivamente.

Figura 6: Correlación de los niveles de glicoproteína 2 isoforma a (GP2a) (A,C) y GP2 total (GP2t) (B,D) con concentraciones de procalcitonina (PCT) (A,B) y proteína de reactivo c (CRP) en 153 pacientes con pancreatitis aguda. Los límites optimizados para GP2a y GP2t obtenidos por el análisis de la curva de eficacia diagnóstica y los generalmente aceptados para CRP y PCT se ilustraron por líneas horizontales y verticales discontinuas, respectivamente. (Los límites optimizados para GP2a y GP2t obtenidos por el análisis de la curva de eficacia diagnóstica del receptor así como el límite establecido de procalcitonina y proteína reactiva C se ilustraron por líneas discontinuas).

Figura 7: Niveles de glicoproteína 2 isoforma a (GP2a), procalcitonina (PCT), y proteína del reactivo c (CRP) en suero en las muestras de seguimiento de pacientes con pancreatitis aguda (PA). Los pacientes con PA con muestras de seguimiento disponibles entre el 2º y 49º día de duración de la enfermedad:

- A, macho, 47 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones locales
- B, macho, 31 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones sistémicas
- C, macho, 48 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones locales
- D, macho, 31 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones sistémicas
- pacientes con PA con incremento tardío de GP2a (> 10º día)
- E, hembra, 65 años, biliar, PA grave con resultado letal
- F, hembra, 83 años, biliar, PA grave con resultado letal
- G, macho, 59 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones sistémicas
- H, macho, 26 años, abuso del alcohol, PA grave con complicaciones sistémicas

Figura 8: Asociación de la glicoproteína isoforma a 2 (GP2a) y GP2 total (GP2t) en suero con gravedad de la enfermedad. Los niveles de GP2a (A,C) y GP2t (B,D) se detectaron por ELISA en pacientes con pancreatitis aguda (PA) con enfermedad leve (I), enfermedad grave con complicaciones locales (II), enfermedad grave con complicaciones sistémicas (III), y enfermedad grave con resultado letal. (Los límites optimizados para GP2a y GP2t obtenidos por análisis de la curva de eficacia diagnóstica se ilustraron por líneas horizontales discontinuas. Los datos se presentan en diagramas de caja y bigotes con valores lejanos, definidos como valores que son menores que el cuartil inferior menos 3 veces el rango intercuartílico, o mayores que el cuartil superior más 3 veces el rango intercuartílico, presentados como triángulos sólidos).

Ejemplos

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

5 **Materiales:**

Sujetos

10 Las características de los 153 pacientes con pancreatitis aguda y 752 controles que incluyen 26 pacientes con PC, 125 con CP, 118 con CH, 126 con CGI, 40 con tumores neuroendocrinos (TNE), 40 con sarcoma (SA), 109 con enfermedad de hígado y biliar benigna (bL/BD), 27 con úlcera péptica (UP), 40 con peritonitis (PT), y 101 donantes de sangre (DS) sanos se dan en la Tabla 4. Según la gravedad de la enfermedad, los pacientes con pancreatitis aguda se estratificaron retrospectivamente en PA leve y grave con complicaciones locales así como sistémicas o

15 casos letales usando los datos clínicos y de imagen.[10;21] Además, la etiología de PA (biliar, abuso del alcohol, idiopática, colangiopancreatografía retrógrada post endoscópica (ERCP), inducida por fármaco) se determinó de acuerdo con las directrices internacionales.[10] Se recogieron sueros de pacientes con PA y controles de enfermedad en el departamento de cirugía de la Otto-von-Guericke University Magdeburg. Para 30 de los 152 pacientes con pancreatitis aguda, se pudo obtener 3 o más muestras consecutivas. Por tanto, se incluyeron 128 muestras adicionales en el estudio que cubrieron un periodo de observación media de 28 días (rango intercuartílico [RIQ] 28 días). Cabe destacar que, la duración de la enfermedad desde la aparición clínica de PA hasta el primer

20 examen de la unidad de cuidados intensivos del departamento de cirugía se determinó para todos los pacientes. Para 152 y 146 pacientes con PA, pudo obtenerse niveles de CRP y procalcitonina (PCT), respectivamente.

25 Todos los diagnósticos clínicos se basaron en criterios clínicos convencionales, de obtención de imágenes, endoscópicos e histológicos. El diagnóstico de PC se estableció usando un sistema de puntuación basado en la presentación de calcificaciones o anomalías del conducto pancreático, evidencia de insuficiencia pancreática, y dolor abdominal, pérdida de peso o intolerancia a la glucosa.[22]

30 El estudio se aprobó por el comité ético local y cumple con la "World Medical Association Declaration" de Helsinki en relación con la conducta ética de la investigación en seres humanos y/o animales. Se usaron alícuotas de los sueros almacenados a -80 °C para detectar los niveles de GP2 en suero.

Tabla 4: Características de los pacientes y los donantes de sangre (DS)

trastorno	Número (%)	Edad (RIQ)	Género (f/m)
pancreatitis aguda	153	50,0 (28,0)	58/95
etiología			
abuso del alcohol	59 (38,6)	40,0 (12,0)	11/48
enfermedad biliar	54 (35,3)	65,0 (24,0)	30/24
inducido por fármaco	1 (0,7)	50,0	0/1
idiopático	21 (13,7)	61,0 (24,8)	11/10
postrauma	11 (7,2)	57,0 (19,0)	2/9
post-ERCP	7 (4,6)	59,0 (39,5)	4/3
gravedad			
leve	22 (14,4)	57,5 (29,0)	14/8
complicaciones locales	74 (48,4)	45,5 (30,0)	27/47
complicaciones sistémicas	41 (26,8)	54,0 (28,5)	11/30
resultado letal	16 (10,5)	65,6 (29,0)	6/10
pancreatitis crónica	26	48,0 (19,0) [§]	13/13 ^{&}
cáncer de páncreas	125	60,0 (16,0)	68/57
carcinoma pancreático	25	60,5 (15,2) [§]	8/17 ^{&}
carcinoma papilar	36	63,0 (17,5)	16/20 ^{&}
neoplasia quística pancreática	34	61,0 (16,0)	27/7
NMPI	18	64,0 (12,0)	10/8 ^{&}

tumor de células de los islotes	12	49,0 (14,5) [§]	7/5 [§]
cáncer de hígado	118	64,0 (11,0)	59/59
cáncer hepatocelular	40	64,0 (12,2)	20/20 [§]
cáncer colangiocelular	38	63,0 (8,2)	19/19 [§]
cistadenocarcinoma colangiocelular	40	66,0 (9,0)	20/20 [§]
gravedad			
cáncer gastrointestinal	126	63,3 (16,8)	54/72 [§]
esófago de Barrett	26	63,5 (9,5)	6/20 [§]
cáncer gástrico	40	69,0 (14,2)	20/20 [§]
TEGI	26	62,5 (16,5)	11/15 [§]
carcinoma de colon	34	58,0 (24,2) [§]	17/17 [§]
tumores neuroendocrinos	40	62,5 (19,5)	20/20 [§]
sarcoma	40	61,0 (16,2)	20/20 [§]
enfermedad de hígado/biliar benigna	109	56,0 (24,0)	78/31
enfermedad de hígado benigna	46	43,5 (23,8)	38/8
quiste hepático	23	59,0 (9,0) [§]	20/3
enfermedad biliar benigna	40	61,0 (19,8)	20/20 [§]
úlcera péptica	27	63,0 (12,0)	7/20 [§]
peritonitis	40	66,0 (24,8)	20/20 [§]
donantes de sangre	101	27,5 (15,0)	39/62 [§]
<i>ERCP, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica; f, femenino; TEGI, tumor estromal gastrointestinal; NMPI, neoplasia mucinosa papilar intraductal; RIQ, rango intercuartílico; m, masculino</i>			
<i>[§]edad no significativamente diferente a la edad de los pacientes con pancreatitis aguda (p > 0,05)</i>			
<i>[§]distribución de género no significativamente diferente a la de los pacientes con pancreatitis aguda (p > 0,05)</i>			

Producción de anticuerpo anti-GP2

Las GP2a y GP2b humanas se expresaron en el sistema de baculovirus como se describe en otra parte. En resumen, se usaron los plásmidos pcDNA3.1+GP2-trunc-Thrombin-His (GP2a, CCS GmbH, Hamburg, Alemania) y pBluescript-GP2 (GP2b, ThermoScientific, Braunschweig, Alemania) los cuales codifican las respectivas secuencias de aminoácidos de la isoforma. En el extremo C terminal, el anclaje GPI se reemplazó por una etiqueta His6. Las dos isoformas se clonaron dentro de pVL1392, respectivamente y las construcciones resultantes se verificaron por secuenciación. Se realizó transfección dentro y cultivo de células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf) 9 como se describe en otra parte.[23] Las isoformas de GP2 se purificaron de sobrenadantes recogidos por cromatografía de Niquelato.

Los anticuerpos policlonales para GP2 se produjeron inmunizando conejos con isoformas de GP2 humanas recombinantes según un protocolo de inmunización convencional (tres ciclos de la inyección de 100 µg de proteína). Se purificaron por cromatografía por afinidad empleando GP2a recombinante inmovilizada en sephadex.

Los anticuerpos monoclonales que reconocen las isoformas GP2a y GP2b se desarrollaron inmunizando ratones Balb/c con inmunoconjugados modificados. Las isoformas de GP2 se acoplaron a la principal proteína de la cápsida VP1 de poliovirus de hámster (HaPyV) por enlace de glutaraldehído según los procedimientos convencionales. La expresión de HaPyV-VP1 recombinante y el procedimiento de inmunización se realizaron como previamente se ha publicado.[24] La selección de los anticuerpos monoclonales específicos a GP2 se realizó por ELISA como se describe en otra parte.[25]

ELISA para la detección de GP2a y GP2t

Se evaluaron GP2a y GP2t en muestras de suero de pacientes y controles por ELISA. El anticuerpo monoclonal anti-GP2a K9 o los anticuerpos policlonales de conejo anti-GP2 a una concentración de 1 µg/ml se cubrieron sobre placas de microtitulación Maxisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en tampón de recubrimiento (pH = 9,5) a 4 °C durante la noche. Después de bloquear con albúmina de suero bovino al 1 % (p/v) en solución salina tamponada con Tris 50 mM (pH = 7,4) (Sigma Co, Taufkirchen, Alemania) a temperatura ambiente durante una hora, las placas se sellaron para más uso. Para la detección de GP2a y GP2t, se incubaron muestras de suero diluidas 1/100 en solución salina tamponada con Tris 50 mM (pH = 7,4) con BSA al 0,2 % (p/v) a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 al 0,1 % (v/v) (Sigma). Se añadieron

anticuerpos policlonales anti GP2 humana marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se revelaron con sustrato de peróxido de hidrógeno/tetrametilbenzidina listo para usar (Seramun, Heidessee, Alemania). La conjugación de los anticuerpos anti-GP2 policlonales purificados por afinidad y HRP se hizo por la técnica de periodato de sodio como se describe en otra parte.[26]

5 La reacción se paró con 0,25 mol/l de ácido sulfúrico y después de 15 min. La densidad óptica de las muestras se leyó usando un lector de microplaca (SLT, Crailsheim, Alemania) a una longitud de onda de 450 nm/620 nm. Se usó GP2a recombinante purificada como material estándar y los niveles de GP2 se expresaron en ng/ml.

10 Para los experimentos de interferencia, los sueros que contenían GP2 se enriquecieron con hemoglobina, triglicéridos, bilirrubina, proteína Tamm-Horsfall homóloga urinaria de GP2 (uromodulina) (Sigma Co). Las concentraciones finales eran de 0,0 a 2,5 g/l para hemoglobina, 30,0 a 100,0 mg/l para bilirrubina, 5,7 a 25,0 g/l para triglicéridos y 0,0 a 10,0 g/l para uromodulina.

15 **Análisis estadístico**

Se usó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para rechazar la distribución normal de los datos. Por tanto, los valores medidos se expresaron como medianas con RIQ. La prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, de dos colas se usó para analizar las diferencias estadísticamente significativas de muestras independientes en 2 o más grupos. La comparación de las muestras independientes entre dos grupos se realizó por la prueba de Mann-Whitney de dos colas.

20 La prueba de correlación del rango de Spearman se aplicó para la comparación dentro de grupo. La comparación de las tasas de prevalencia entre los grupos se realizó por la prueba exacta de Fisher de dos colas. Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos. La realización del ensayo y la comparación del mismo se analizaron por el análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC). Todos los cálculos se realizaron usando el programa informático estadístico Medcalc (Medcalc, Mariakerke, Bélgica).

30 **Ejemplo 1: Desarrollo de ELISA anti-GP2**

Para el desarrollo de ELISA anti-GP2, se pudo generar un anticuerpo monoclonal para GP2a, K9 codificado, con un protocolo de inmunización especial que era necesario debido a varios intentos sin éxito de inmunizar ratones con GP2a recombinante humana. K9 reconoció GP2a recombinante soluble fácilmente en su estado nativo y desnaturalizado, pero no GP2b cuando se usó como anticuerpo inmovilizado en fase sólida en ELISA (Figura 1). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal solo P102 generado con éxito para la isoforma más corta GP2b interactuó con ambas isoformas inmovilizadas en ELISA pero con GP2 soluble a solamente una fuerza de unión baja lo cual no permitió desarrollar un ELISA sensible para GP2b (Figura 1). Por tanto, K9 se empleó como un anticuerpo en fase sólida para el desarrollo de un ELISA para el análisis de GP2a y anticuerpos policlonales de conejo anti-GP2 purificados por afinidad para la evaluación de GP2t, respectivamente. Posteriormente, se detectaron GP2a y GP2t unidos por anticuerpos anti-GP2 purificados por afinidad policlonales marcados con HRP.

50 **Ejemplo 2: Regresión de los niveles de GP2a y GP2t**

Como cabía esperar, los niveles de GP2a y GP2t se relacionaron linealmente entre sí ($y = -0,05 + 0,41x$, coeficiente de determinación $[R^2] = 0,49$) cuando se analizaron las muestras de todos los pacientes con PA y los controles (Figura 2). Sin embargo, el análisis de regresión en los pacientes con PA solo revelaron un mayor R^2 de 0,72 en comparación con los controles ($R^2 = 0,29$) y una pendiente e intersección significativamente diferentes ($P < 0,0001$, $=0,0001$, respectivamente). Esto indica una escasa asociación de los niveles de GP2a y GP2t en los controles en comparación con pacientes con PA.

55 **Ejemplo 3: Correlación de los niveles de GP2a y GP2t con la duración de la enfermedad**

Curiosamente, tanto GP2a como GP2t mostraron una correlación significativamente negativa con la duración de la enfermedad en PA (Figura 3) (Coeficiente de correlación de rango de Spearman $[\rho] = -0,22$, 95 % intervalo de confianza $[IC] -0,37$ a $-0,07$, $p = 0,0053$; $\rho = -0,41$, 95 % IC $-0,54$ a $-0,27$, $p < 0,0001$; respectivamente). Para evaluación adicional, se estratificaron pacientes con PA en 3 grupos que cubrían las muestras de pacientes con PA con duración de la enfermedad de ≤ 3 días ($n = 12$), con duración de la enfermedad de 4 a 10 días ($n = 47$) y mayor que 10 días ($n = 94$) (Tabla 5).

Tabla 5: Prevalencias de la GP2 total (GP2t) e isoforma alfa (GP2a) positivas detectadas por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en 153 pacientes con pancreatitis aguda y 752 controles que emplean 2,3 y 0,7 ng/ml como límites optimizados, respectivamente.

trastorno	n	GP2a (%)	GP2t (%)
pancreatitis aguda	153	40 (26,1)	39 (25,5)
duración de la enfermedad			
<= tercer día de enfermedad	12	11 (91,7) ^{\$\$\$}	11 (91,7) ^{\$\$\$}
<= cuarto día de enfermedad	30	16 (53,3) ^{\$\$&}	14 (46,7) ^{\$&}
<= décimo día de enfermedad	59	26 (44,1) ^{\$&&}	25 (42,4) ^{\$&&}
(etiología			
abuso del alcohol	59	19 (32,2)	17 (28,8)
enfermedad biliar	54	9 (16,7)	8 (14,8)
inducido por fármaco	1	1 (100,0)	1 (100,0)
idiopático	21	8 (38,1)	9 (42,9)
postrauma	11	3 (27,3)	4 (36,4)
post-ERCP	7	0(0,0)	0 (0,0)
gravedad			
leve	22	2(9,1)	2 (9,1)
complicaciones locales	74	24 (32,4)	25 (33,8)
complicaciones sistémicas	41	7 (17,1)	6 (14,6)
resultado letal	16	7 (43,8)	6 (37,5)
controles de enfermedad y donantes de sangre	752	28 (3,7) ^{\$\$\$&&&}	56 (7,4) ^{\$\$\$&&&}
pancreatitis crónica	24	3 (12,5) ^{&&&}	3 (12,5) ^{&&&}
cáncer de páncreas	125	11 (8,8) ^{\$\$\$&&&}	14 (11,2) ^{\$\$&&&}
carcinoma pancreático	25	2 (8,0) ^{\$&&&}	4 (16,0) ^{&&&}
carcinoma papilar	36	4 (n.1) ^{&&&}	5 (13,9) ^{&&&}
neoplasia quística pancreática	34	1 (2,9) ^{\$\$&&&}	3 (8,8) ^{\$&&&}
NMPI	18	3 (16,7) ^{&&&}	2 (11 1) ^{&&&}
tumor de células de los islotes	12	1 (8,3) ^{&&}	0 (0,0) ^{&&&}
cáncer de hígado	118	5 (4,2) ^{\$\$\$&&&}	18 (15,2) ^{&&&}
cáncer hepatocelular	40	1 (2,5) ^{\$\$\$&&&}	9 (22,5) ^{&&}
cáncer colangiocelular	38	2 (5,3) ^{\$\$&&&}	5 (13,2) ^{&&&&}
colangiocelular cistadenocarcinoma	40	2 (5,0) ^{\$\$&&&}	4 (10,0) ^{&&&}
cáncer gastrointestinal	126	2 (1,6) ^{\$\$\$&&&}	6 (4,8) ^{\$\$\$&&&}
esófago de Barrett	26	0 (0,0) ^{\$\$&&&}	0 (0,0) ^{\$&&&}
cáncer gástrico	40	1 (2,5) ^{\$\$&&&}	3 (7,5) ^{\$&&&}
TEGI	26	0 (0,0) ^{\$\$&&&}	1 (3,8) ^{\$&&&}
carcinoma de colon	34	1 (2,9) ^{\$\$&&&}	2 (5,9) ^{\$&&&}
tumores neuroendocrinos	40	1 (2,5) ^{\$\$&&&}	3 (7,5) ^{\$&&&}
Sarcoma	40	1 (2,5) ^{\$\$&&&}	1 (2,5) ^{\$\$&&&}
enfermedad de hígado/vesícula biliar benigna	109	2 (1,8) ^{\$\$\$&&&}	2 (1,8) ^{\$\$\$&&&}
enfermedad de hígado benigna	46	0 (0,0) ^{\$\$\$&&&}	0 (0,0) ^{\$\$\$&&&}
quiste hepático	23	1 (4,3) ^{\$&&&}	1 (4,3) ^{\$&&&}
enfermedad de vesícula biliar benigna	40	1 (2,5) ^{\$\$&&&}	1 (2,5) ^{\$\$\$&&&&}
úlcera péptica	27	1 (3,7) ^{\$\$&&&}	2 (7,4) ^{\$&&&}
peritonitis	40	2 (5,0) ^{\$\$&&&}	5 (12,5) ^{&&&}
donantes de sangre	101	0 (0,0) ^{\$\$\$&&&}	2 (2,0) ^{\$\$\$&&&}

TEGI, tumor estromal gastrointestinal; NMPI, neoplasia mucinosa papilar intraductal;
 § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,0001$; comparación de la prevalencia de GP2 con la de en todos los casos de pancreatitis aguda por prueba de Fisher:
 & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,0001$; comparación de la prevalencia de GP2 con la de en la pancreatitis aguda <= tercer día de enfermedad por prueba de Fisher:

Ejemplo 4: Comparación de los niveles de GP2a y GP2t en PA y grupos control

Los pacientes con PA se emparejaron por edad y género con pacientes que padecían PC, CP, tumor de células de los islotes, y carcinoma de colon ($p > 0,05$, prueba de Kruskal Wallis y análisis post hoc, prueba de Fisher, respectivamente).

Las GP2a y GP2t en suero determinadas por ELISA mostraron niveles significativamente diferentes en 153 pacientes con PA y 752 controles ($p < 0,0001$, prueba de Kruskal Wallis) (Figura 4A,B). Por tanto, los niveles medios de GP2a y GP2t en pacientes con PA con duración de la enfermedad <= 3 días, con duración de la enfermedad de 4 a 10 días, y con duración de la enfermedad > 10 días desde el primer día de ocurrencia de los síntomas clínicos mostraron un descenso significativo de periodo de tiempo a periodo de tiempo (análisis post hoc, $p > 0,05$, respectivamente). Los niveles medios de GP2a y GP2t en pacientes con PA hasta el 3º día de la duración de la enfermedad eran significativamente elevados en comparación con todos los grupos control que incluían pacientes con pancreatitis crónica (análisis post hoc, $p < 0,05$, respectivamente). El nivel medio de GP2t de pacientes con PA con > 10 días de duración de la enfermedad además no era diferente en pacientes con CGI, TNE, SA e incluso PC (análisis post hoc, $p < 0,05$, respectivamente).

Ejemplo 5: Comparación de la realización del ensayo de GP2a y GP2t

Para tener en cuenta el descenso de los niveles de GP2 con el tiempo, se obtuvieron los respectivos límites de GP2 optimizados para la discriminación de pacientes con PA de controles por el análisis de la curva ROC empleando pacientes con PA aún el 3º día de enfermedad como criterios positivos y todos los 752 controles de enfermedad, y DS como criterios negativos (Figura 5). La comparación de las curvas ROC revelaron un área bajo la curva (ABC) significativamente mayor para GP2a en los 3 primeros días de enfermedad a diferencia de GP2t (Figura 5) (0,93, 95 % IC: 0,91 a 0,95 vs 0,90, 95 % IC: 0,88 a 0,92, $p = 0,0427$). Por tanto, el ELISA contra GP2a poseía una precisión de ensayo significativamente mejor con una sensibilidad del 91,7 % (95 % IC: 61,5 % a 99,8 %) y una especificidad de 96,7 % (95 % IC: 95,1 % a 97,8 %). El ELISA contra GP2t demostró la misma sensibilidad pero una escasa especificidad de 92,6 % (95 % IC: 90,4 % a 94,3 %). En conjunto, estos datos dieron como resultado una razón de verosimilitud (RV) positiva de 24,6 (95 % IC: 16,5 a 36,8) y un -RV de 0,09 (95 % IC: 0,01 a 0,57) para GP2a mientras el +RV de GP2t alcanzaba 12,3 (95 % IC: 9,1 a 16,7) en el mismo -RV como GP2a solamente.

Ejemplo 6: Comparación de positividad de GP2a y GP2t en pacientes con PA y controles

Los límites obtenidos por el análisis de la curva ROC de 0,7 ng/ml para GP2a y 2,3 ng/ml para GP2t se usaron para definir la prevalencia de positivos en pacientes con PA y controles (Tabla 5). Hubo una disminución notable en la prevalencia de positivos de GP2a y GP2t después del 3º día de enfermedad (53,3 % y 46,7 %, respectivamente). En los primeros 10 días de la duración de la enfermedad la prevalencia cayó a 44,1 % y 42,4 %, respectivamente.

El ELISA contra GP2a reveló significativamente menos falsos positivos en comparación con el ensayo de GP2t (28/752 vs 56/752, $p = 0,0022$). Esto era básicamente debido a la significativamente mayor prevalencia de hallazgos de GP2t falso positivo a diferencia de GP2a una vez en pacientes con cáncer de hígado (18/118 vs 5/118, $p = 0,0073$) y aquí en particular en pacientes con cáncer hepatocelular (9/40 vs 1/40, $p = 0,0143$).

Ejemplo 7: Niveles de GP2a y GP2t y positividad en variantes de PA etiológicas

Los niveles de GP2a y GP2t eran significativamente diferentes en los 153 pacientes con PA con distinta etiología (prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0,0144$ y $0,0199$, respectivamente). De acuerdo con el análisis post hoc, los pacientes con PA idiopática y alcohólica mostraron niveles de GP2a y GP2t significativamente elevados a diferencia de pacientes con PA con enfermedad biliar y PA postrauma ($p < 0,05$, respectivamente). Las respectivas diferencias en la prevalencia de la positividad de GP2a, sin embargo, no alcanzaron significancia ($p = 0,0803$, $0,0657$). Por el contrario, hubo una prevalencia significativamente mayor de GP2t en pacientes con PA con enfermedad idiopática en comparación con pacientes con PA biliar (9/21 vs 8/54, $p = 0,0143$). Cabe destacar que, la duración de la enfermedad no era significativamente diferente en los grupos de paciente con PA con varias etiologías (prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0,0997$).

Ejemplo 8: Correlación de GP2a y GP2t con CRP y PCT

Los niveles de GP2a y GP2t se correlacionaron significativamente con PCT ($\rho = 0,21$, 95 % IC: 0,05 a 0,36 y 0,26, 95 % IC: 0,11 a 0,41; $p = 0,0110$ y $0,0012$; respectivamente) así como valores de CRP ($\rho = 0,37$, 95 % IC: 0,22 a 0,50 y 0,40, 95 % IC: 0,26 a 0,53; $p < 0,0001$; respectivamente) en 152 y 146 muestras de seguimiento de pacientes con PA, respectivamente (Figura 6).

En general, los niveles de GP2a y GP2t descendieron rápidamente después del 3º día de enfermedad. Sin embargo, los pacientes con PA grave mostraron niveles de GP2a elevados hasta el 21º día de la duración de la enfermedad con un descenso constante con el tiempo (Figura 7A). En particular los niveles de CRP mostraron una modulación similar que correspondía con el éxito de la terapia (Figura 7A,B,C,D). En casos graves con resultado letal, hubo un comportamiento sorprendentemente similar de los niveles de GP2a y PCT en los momentos más allá del 10º día de duración de la enfermedad (Figura 7E,F). En estos dos casos, se pudo observar una elevación combinada de GP2a y PCT poco antes de la muerte de los pacientes. Asimismo, el paciente con PA ilustrado en la Figura 7E mostró un interesante incremento simultáneo y posterior descenso de los niveles de GP2a y PCT en respuesta a la importante cirugía intestinal sobre la enfermedad el día 34. Cabe destacar que, se pudo determinar incrementos en los niveles de GP2a incluso después del 50º día de duración de la enfermedad (Figura 7G,H). Los niveles de GP2t mostraron alteraciones similares que GP2a (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Predicción de la gravedad de PA por los niveles de GP2a y GP2t

Dada la asociación establecida de los niveles de GP2a y GP2t con los marcadores de la gravedad de la enfermedad PCT y CRP en muestras de seguimiento, los pacientes con PA se estratificaron en 4 grupos según la gravedad de la enfermedad: I PA leve, II enfermedad grave con complicaciones locales, III enfermedad grave con complicaciones sistémicas, y IV enfermedad grave con resultado letal, retrospectivamente. Hubo una tendencia de una prevalencia mayor de la positividad de GP2a y GP2t en los 131 pacientes con PA grave (II, III, IV) en comparación con los 22 pacientes con PA leve ($p = 0,0650$ y $0,0660$, respectivamente). Cabe destacar que, hubo una diferencia significativa de la positividad de GP2a con un límite inferior de $0,4$ ng/ml obtenido por el análisis de la curva ROC con todos los 153 pacientes con PA incluidos ($45/131$ vs $2/22$, $p = 0,0226$). La reducción similar del límite para GP2t no dio como resultado una diferenciación significativa de PA leve y grave.

Notablemente, los pacientes con PA con resultado letal durante el periodo de observación no mostraron una prevalencia significativamente mayor de GP2a y GP2t en comparación con los casos leves en el día de admisión a la unidad quirúrgica de cuidados intensivos ($7/16$ vs $2/22$, $6/16$ vs $2/22$, $p = 0,0211$, $0,0497$; respectivamente). Esto dio como resultado un cociente de probabilidades de $7,8$ (95 % IC: $1,3$ a $45,1$, $p = 0,0222$) para GP2a y $6,0$ (95 % IC: $1,0$ a $35,3$, $p = 0,0474$) para la positividad de GP2t en relación con el pronóstico de un resultado letal en PA en el día de la admisión. Cuando se consideraron solamente los pacientes con PA admitidos hasta el 10º día de enfermedad, hubo también una positividad de GP2a significativamente mayor en pacientes con PA con resultado letal en comparación con pacientes con enfermedad leve ($5/6$ vs $1/7$, $p = 0,0291$).

Ejemplo 10: Realización de ensayo del ELISA de GP2a

Puesto que el análisis de GP2a probó que es superior en términos de precisión diagnóstica, la realización de ensayo de este ELISA se analizó para el uso rutinario. El límite de detección de GP2a se determinó a $0,2$ ng/ml usando GP2a recombinante.

La linealidad se evaluó diluyendo una muestra con una alta concentración de GP2a con cantidades incrementadas (de 0 % a 100 % en incrementos de 20 %) de una muestra que no contenía GP2a de $0,5$ ng/ml a 6 ng/ml. Hubo buena linealidad con un valor de R^2 de $0,99$ para GP2a.

Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo (CV) se analizaron usando sueros con distintas concentraciones de GP2a de acuerdo con el protocolo CLSI EP15-A2. Los CV intraensayo oscilaron de $6,4$ % a $15,0$ % y el CV interensayo de $7,7$ % a $30,0$ % para niveles de GP2a de $3,9$ a $0,2$ ng/ml, respectivamente (Tabla 6).

Los experimentos de recuperación para la evaluación de GP2a se condujeron enriqueciendo el suero humano desprovisto de GP2a con GP2a recombinante. La recuperación de GP2a y GP2t osciló de $92,3$ % a $113,6$ % para niveles de GP2a y GP2t enriquecidos de $0,25$ a $1,25$ ng/ml.

Para los experimentos de interferencia, los sueros que contenían GP2 se enriquecieron con hemoglobina, triglicéridos, bilirrubina y proteína Tamm-Horsfall urinaria de GP2 (uromodulina) que se sintetiza en las células tubulares de la rama ascendente gruesa y el túbulo distal temprano en los riñones. Las concentraciones finales de $1,0$ g/l de hemoglobina, $30,0$ mg/l de bilirrubina, $25,0$ g/l de triglicéridos, y $10,0$ g/l de uromodulina no interfirieron con la medida de los niveles de GP2a.

Tabla 6: Variación intra e interensayo del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección de la isoforma alfa de la glicoproteína 2 (GP2a). Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo se analizaron usando sueros con distintas concentraciones de GP2a. Se determinó el CV intraensayo por ocho medidas para cada suero mientras que se evaluó el CV interensayo analizando ocho determinaciones para cada suero en cinco días diferentes de acuerdo con el protocolo CLSI EP15-A2. DT, desviación típica

varianza intraensayo			
GP2a (ng/ml)	3,9	0,8	0,2
n = 8			
DT	0,25	0,08	0,03
% de CV	6,4	10,0	15,0
varianza interensayo			
GP2a (ng/ml)	3,9	0,8	0,2
5 días			
DT	0,30	0,08	0,06
% de CV	7,7	10,0	30,0

Abreviaturas

- 5 PA, pancreatitis aguda; ABC, área bajo la curva; IMC; índice de masa corporal; PC, pancreatitis crónica, DS, donante de sangre; IC, intervalo de confianza; CV, coeficiente de variación; ERCP, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; CGI, cáncer gastrointestinal; TEGl, tumor estromal gastrointestinal; GP2, glicoproteína 2 de membrana de gránulo de zimógeno; GPI, glicosilo fosfatidilinositol; NMPI, neoplasia mucinosa papilar intraductal; RIQ, rango intercuartílico; HC, cáncer de hígado; RV, razón de verosimilitud; TNE, tumor neuroendocrino; CP, cáncer de páncreas; PT, peritonitis; UP, úlcera péptica; rho, coeficiente de correlación de rango de Spearman; ROC, curva de eficacia diagnóstica; SA, sarcoma; DT, desviación típica; GZ, gránulos de zimógeno.

Bibliografía

- 15 1 Peery A.F., Dellon E.S., Lund J. et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. 2012;143:1179-1187.
- 2 Lippi G., Valentino M., Cervellin G. Laboratory diagnosis of acute pancreatitis: in search of the Holy Grail. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2012;49:18-31.
- 20 3 Muller C.A., Appelros S., Uhl W. et al. Serum levels of procarboxypeptidase B and its activation peptide in patients with acute pancreatitis and non-pancreatic diseases. *Gut*. 2002;51:229-235.
- 4 Lankisch P.G., Apte M., Banks P.A. Pancreatitis aguda. *Lancet*. 2015;386:85-96.
- 25 5 Afghani E., Pandol S.J., Shimosegawa T. et al. Acute Pancreatitis-Progress and Challenges: A Report on an International Symposium. *Pancreas*. 2015;44:1195-1210.
- 6 Lerch M.M., Halangk W. Human pancreatitis and the role of cathepsin B. *Gut*. 2006;55:1228-1230.
- 30 7 Sendler M., Maertín S., John D. et al. Cathepsin-B activity initiates apoptosis via digestive protease activation in pancreatic acinar cells and experimental pancreatitis. *J. Biol. Chem.* 2016.
- 8 Leppkes M., Maueroeder C., Hirth S. et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat. Commun.* 2016;7:10973.
- 35 9 Meher S., Mishra T.S., Sasmal P.K. et al. Role of Biomarkers in Diagnosis and Prognostic Evaluation of Acute Pancreatitis. *J. Biomark.* 2015;2015:519534.
- 10 Banks P.A., Bollen T.L., Dervenis C. et al. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62:102-111.
- 11 Keim V., Teich N., Fiedler F. et al. A comparison of lipase and amylase in the diagnosis of acute pancreatitis in patients with abdominal pain. *Pancreas*. 1998;16:45-49.
- 45 12 Da B.L., Shulman I.A., Joy L.C. et al. Origin, Presentation, and Clinical Course of Nonpancreatic Hyperlipasemia. *Pancreas*. 2016;45:846-849.

13 Mantke R., Pross M., Kunz D. et al. Soluble thrombomodulin plasma levels are an early indication of a lethal course in human acute pancreatitis. *Surgery*. 2002;131:424-432.

14 Mofidi R., Suttie S.A., Patil P.V. et al. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: systematic review. *Surgery*. 2009;146:72-81.

15 Lowe A.W., Luthen R.E., Wong S. et al. The Level of the Zymogen Granule Protein GP2 Is Elevated in a Rat Model for Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 1994,107. 1994;107:1819-1827.

16 Rindler M.J., Hoops T.C. The pancreatic membrane protein GP-2 localizes specifically to secretory granules and is shed into the pancreatic juice as a protein aggregate. *Eur. J. Cell Biol.* 1990;53:154-163.

17 Havinga J.R., Slot J.W., Strous G.J. Membrane detachment and release of the major membrane glycoprotein of secretory granules in rat pancreatic exocrine cells. *Eur. J. Cell Biol.* 1985 Nov;39(1):70-6. 1985;39:70-76.

18 LeBel D., Beattie M. The major protein of pancreatic zymogen granule membranes (GP-2) is anchored via covalent bonds to phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988;154:818-823.

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

20 Hao Y., Wang J., Feng N. et al. Determination of plasma glycoprotein 2 levels in patients with pancreatic disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004;128:668-674.

21 Lerch M.M. Classifying an unpredictable disease: the revised Atlanta classification of acute pancreatitis. *Gut*. 2013;62:2-3.

22 Hoffmeister A., Mayerle J., Beglinger C. et al. English language version of the S3-consensus guidelines on chronic pancreatitis: Definition, aetiology, diagnostic examinations, medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis. *Z. Gastroenterol.* 2015;53:1447-1495.

23 Roggenbuck D., Reinhold D., Wex T. et al. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta.* 2011;412:718-724.

24 Messerschmidt K., Hempel S., Holzlohner P. et al. IgA antibody production by intrarectal immunization of mice using recombinant major capsid protein of hamster polyomavirus. *Eur. J. Microbiol. Immunol (Bp).* 2012;2:231-238.

25 Roggenbuck D., Rober N., Bogdanos D.P. et al. Autoreactivity to isoforms of glycoprotein 2 in inflammatory bowel disease. *Clin. Chim. Acta.* 2015;442:82-83.

26 Wilson M.B., Nakane P.K. The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation. *J. Immunol. Methods.* 1976;12:171-181.

27 Wong S.M., Lowe A.W. Sequence of the cDNA encoding human GP-2, the major membrane protein in the secretory granule of the exocrine pancreas. *Gene*. Vol. 171, no. 2, 1 de junio de 1996 (1996-06-01), páginas 311-312.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GA Generic Assays GmbH

<120> Método para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) mediante la detección de glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2A)

<130> XII 2152/16WO

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 537

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
1          5          10          15
Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Gly
20          25          30
Tyr Gly Asn Pro Ile Glu Ala Ser Ser Tyr Gly Leu Asp Leu Asp Cys
35          40          45
Gly Ala Pro Gly Thr Pro Glu Ala His Val Cys Phe Asp Pro Cys Gln
50          55          60
Asn Tyr Thr Leu Leu Asp Glu Pro Phe Arg Ser Thr Glu Asn Ser Ala
65          70          75          80
Gly Ser Gln Gly Cys Asp Lys Asn Met Ser Gly Trp Tyr Arg Phe Val
85          90          95
Gly Glu Gly Gly Val Arg Met Ser Glu Thr Cys Val Gln Val His Arg
100         105         110
Cys Gln Thr Asp Ala Pro Met Trp Leu Asn Gly Thr His Pro Ala Leu
115         120         125
Gly Asp Gly Ile Thr Asn His Thr Ala Cys Ala His Trp Ser Gly Asn
130         135         140
Cys Cys Phe Trp Lys Thr Glu Val Leu Val Lys Ala Cys Pro Gly Gly
145         150         155         160
Tyr His Val Tyr Arg Leu Glu Gly Thr Pro Trp Cys Asn Leu Arg Tyr
165         170         175
Cys Thr Val Pro Arg Asp Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys
180         185         190
Ala Cys Arg Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly
195         200         205
Cys Phe Cys Arg Gln Asp Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln
210         215         220
Pro Gln Leu Asp Cys Gly Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys
225         230         235         240
Cys Leu Leu Gly Gly Leu Gly Leu Gly Glu Glu Val Ile Ala Tyr Leu
245         250         255
Arg Asp Pro Asn Cys Ser Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp
260         265         270
Val Ser Val Thr Ser Pro Val Gln Ala Ser Ala Cys Arg Asn Ile Leu
275         280         285
Glu Arg Asn Gln Thr His Ala Ile Tyr Lys Asn Thr Leu Ser Leu Val
290         295         300
Asn Asp Phe Ile Ile Arg Asp Thr Ile Leu Asn Ile Asn Phe Gln Cys
305         310         315         320
Ala Tyr Pro Leu Asp Met Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Leu Gln Pro
325         330         335
Ile Val Ser Ser Leu Asn Val Ser Val Asp Gly Asn Gly Glu Phe Ile

```

```

          340          345          350
Val Arg Met Ala Leu Phe Gln Asp Gln Asn Tyr Thr Asn Pro Tyr Glu
          355          360          365
Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Val Glu Ser Val Leu Tyr Val Gly Ala
          370          375          380
Ile Leu Glu Gln Gly Asp Thr Ser Arg Phe Asn Leu Val Leu Arg Asn
          385          390          395          400
Cys Tyr Ala Thr Pro Thr Glu Asp Lys Ala Asp Leu Val Lys Tyr Phe
          405          410          415
Ile Ile Arg Asn Ser Cys Ser Asn Gln Arg Asp Ser Thr Ile His Val
          420          425          430
Glu Glu Asn Gly Gln Ser Ser Glu Ser Arg Phe Ser Val Gln Met Phe
          435          440          445
Met Phe Ala Gly His Tyr Asp Leu Val Phe Leu His Cys Glu Ile His
          450          455          460
Leu Cys Asp Ser Leu Asn Glu Gln Cys Gln Pro Ser Cys Ser Arg Ser
          465          470          475          480
Gln Val Arg Ser Glu Val Pro Ala Ile Asp Leu Ala Arg Val Leu Asp
          485          490          495
Leu Gly Pro Ile Thr Arg Arg Gly Ala Gln Ser Pro Gly Val Met Asn
          500          505          510
Gly Thr Pro Ser Thr Ala Gly Phe Leu Val Ala Trp Pro Met Val Leu
          515          520          525
Leu Thr Val Leu Leu Ala Trp Leu Phe
          530          535

```

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

<400> 2

```

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
1          5          10          15
Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Gly
          20          25          30
Tyr Gly Asn Pro Ile Glu Ala Ser Tyr Gly Leu Asp Leu Asp Cys
          35          40          45
Gly Ala Pro Gly Thr Pro Glu Ala His Val Cys Phe Asp Pro Cys Gln
          50          55          60
Asn Tyr Thr Leu Leu Asp Glu Pro Phe Arg Ser Thr Glu Asn Ser Ala
          65          70          75          80
Gly Ser Gln Gly Cys Asp Lys Asn Met Ser Gly Trp Tyr Arg Phe Val
          85          90          95
Gly Glu Gly Gly Val Arg Met Ser Glu Thr Cys Val Gln Val His Arg
          100          105          110
Cys Gln Thr Asp Ala Pro Met Trp Leu Asn Gly Thr His Pro Ala Leu
          115          120          125
Gly Asp Gly Ile Thr Asn His Thr Ala Cys Ala His Trp Ser Gly Asn
          130          135          140
Cys Cys Phe Trp Lys Thr Glu Val Leu Val Lys Ala Cys Pro Gly Gly
          145          150          155          160
Tyr His Val Tyr Arg Leu Glu Gly Thr Pro Trp Cys Asn Leu Arg Tyr
          165          170          175
Cys Thr Asp Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys Ala Cys Arg
          180          185          190
Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly Cys Phe Cys
          195          200          205
Arg Gln Asp Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln Pro Gln Leu
          210          215          220
Asp Cys Gly Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys Cys Leu Leu
          225          230          235          240

```

Gly	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Glu	Glu	Val	Ile	Ala	Tyr	Leu	Arg	Asp	Pro		
				245					250					255			
Asn	Cys	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Thr	Glu	Glu	Arg	Asn	Trp	Val	Ser	Val		
			260					265					270				
Thr	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Ser	Ala	Cys	Arg	Asn	Ile	Leu	Glu	Arg	Asn		
			275					280					285				
Gln	Thr	His	Ala	Ile	Tyr	Lys	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Val	Asn	Asp	Phe		
	290					295					300						
Ile	Ile	Arg	Asp	Thr	Ile	Leu	Asn	Ile	Asn	Phe	Gln	Cys	Ala	Tyr	Pro		
305					310					315					320		
Leu	Asp	Met	Lys	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Gln	Pro	Ile	Val	Ser		
				325					330						335		
Ser	Leu	Asn	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Asn	Gly	Glu	Phe	Ile	Val	Arg	Met		
			340					345					350				
Ala	Leu	Phe	Gln	Asp	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asn	Pro	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala		
		355					360					365					
Val	Glu	Leu	Ser	Val	Glu	Ser	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Ala	Ile	Leu	Glu		
	370					375					380						
Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Arg	Phe	Asn	Leu	Val	Leu	Arg	Asn	Cys	Tyr	Ala		
385					390					395					400		
Thr	Pro	Thr	Glu	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Val	Lys	Tyr	Phe	Ile	Ile	Arg		
				405					410				415				
Asn	Ser	Cys	Ser	Asn	Gln	Arg	Asp	Ser	Thr	Ile	His	Val	Glu	Glu	Asn		
			420					425					430				
Gly	Gln	Ser	Ser	Glu	Ser	Arg	Phe	Ser	Val	Gln	Met	Phe	Met	Phe	Ala		
		435					440					445					
Gly	His	Tyr	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	His	Cys	Glu	Ile	His	Leu	Cys	Asp		
	450					455					460						
Ser	Leu	Asn	Glu	Gln	Cys	Gln	Pro	Ser	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Val	Arg		
465					470					475					480		
Ser	Glu	Val	Pro	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro		
				485					490					495			
Ile	Thr	Arg	Arg	Gly	Ala	Gln	Ser	Pro	Gly	Val	Met	Asn	Gly	Thr	Pro		
			500					505					510				
Ser	Thr	Ala	Gly	Phe	Leu	Val	Ala	Trp	Pro	Met	Val	Leu	Leu	Thr	Val		
		515					520					525					
Leu	Leu	Ala	Trp	Leu	Phe												
																	530

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

<400> 3

Met 1	Pro	His	Leu	Met 5	Glu	Arg	Met	Val	Gly 10	Ser	Gly	Leu	Leu	Trp 15	Leu
Ala	Leu	Val	Ser	Cys	Ile	Leu	Thr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Gln	Arg	Val
			20					25					30		
Pro	Arg	Asp	Pro	Ser	Thr	Val	Glu	Asp	Lys	Cys	Glu	Lys	Ala	Cys	Arg
		35					40					45			
Pro	Glu	Glu	Glu	Cys	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Trp	Gly	Cys	Phe	Cys
		50				55				60					
Arg	Gln	Asp	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Val	His	Ser	Leu	Gln	Pro	Gln	Leu
65				70					75					80	
Asp	Cys	Gly	Pro	Arg	Glu	Ile	Lys	Val	Lys	Val	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu
				85					90					95	
Gly	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Glu	Glu	Val	Ile	Ala	Tyr	Leu	Arg	Asp	Pro
			100					105					110		
Asn	Cys	Ser	Ser	Ile	Leu	Gln	Thr	Glu	Glu	Arg	Asn	Trp	Val	Ser	Val
		115					120					125			
Thr	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Ser	Ala	Cys	Arg	Asn	Ile	Leu	Glu	Arg	Asn

[illegible]

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

```

Met Pro His Leu Met Glu Arg Met Val Gly Ser Gly Leu Leu Trp Leu
1      5      10      15
Ala Leu Val Ser Cys Ile Leu Thr Gln Ala Ser Ala Val Gln Arg Asp
20      25      30
Pro Ser Thr Val Glu Asp Lys Cys Glu Lys Ala Cys Arg Pro Glu Glu
35      40
Glu Cys Leu Ala Leu Asn Ser Thr Trp Gly Cys Phe Cys Arg Gln Asp
50      55      60
Leu Asn Ser Ser Asp Val His Ser Leu Gln Pro Gln Leu Asp Cys Gly
65      70      75      80
Pro Arg Glu Ile Lys Val Lys Val Asp Lys Cys Leu Leu Gly Gly Leu
85      90      95
Gly Leu Gly Glu Glu Val Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Pro Asn Cys Ser
100      105      110
Ser Ile Leu Gln Thr Glu Glu Arg Asn Trp Val Ser Val Thr Ser Pro
115      120      125
Val Gln Ala Ser Ala Cys Arg Asn Ile Leu Glu Arg Asn Gln Thr His
130      135      140
Ala Ile Tyr Lys Asn Thr Leu Ser Leu Val Asn Asp Phe Ile Ile Arg
145      150      155      160
Asp Thr Ile Leu Asn Ile Asn Phe Gln Cys Ala Tyr Pro Leu Asp Met
165      170      175

```

```

Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Leu Gln Pro Ile Val Ser Ser Leu Asn
180      185      190
Val Ser Val Asp Gly Asn Gly Glu Phe Ile Val Arg Met Ala Leu Phe
195      200      205
Gln Asp Gln Asn Tyr Thr Asn Pro Tyr Glu Gly Asp Ala Val Glu Leu
210      215      220
Ser Val Glu Ser Val Leu Tyr Val Gly Ala Ile Leu Glu Gln Gly Asp
225      230      235      240
Thr Ser Arg Phe Asn Leu Val Leu Arg Asn Cys Tyr Ala Thr Pro Thr
245      250      255
Glu Asp Lys Ala Asp Leu Val Lys Tyr Phe Ile Ile Arg Asn Ser Cys
260      265      270
Ser Asn Gln Arg Asp Ser Thr Ile His Val Glu Glu Asn Gly Gln Ser
275      280      285
Ser Glu Ser Arg Phe Ser Val Gln Met Phe Met Phe Ala Gly His Tyr
290      295      300
Asp Leu Val Phe Leu His Cys Glu Ile His Leu Cys Asp Ser Leu Asn
305      310      315      320
Glu Gln Cys Gln Pro Ser Cys Ser Arg Ser Gln Val Arg Ser Glu Val
325      330      335
Pro Ala Ile Asp Leu Ala Arg Val Leu Asp Leu Gly Pro Ile Thr Arg
340      345      350
Arg Gly Ala Gln Ser Pro Gly Val Met Asn Gly Thr Pro Ser Thr Ala
355      360      365
Gly Phe Leu Val Ala Trp Pro Met Val Leu Leu Thr Val Leu Leu Ala
370      375      380
Trp Leu Phe
385

```

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

ES 2 845 150 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc	60
tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgaggttatg gaaaccccat tgaagccagt	120
tctgatgggc tggacctgga ctgcggagct cctggcacc cagaggctca tgtctgtttt	180
gacccctgtc agaattacac cctcctggat gaacccttcc gaagcacaga gaactcagca	240
gggtcccagg ggtgcgataa aaacatgagc ggctggtagc gctttgtagg ggaaggagga	300
gtaaggatgt cggagacctg tgtccagggtg caccgatgcc agacagacgc tcccatgtgg	360
ctgaatggga cccaccctgc cttggggat ggcatcacca accacactgc ctgtgcccat	420
tggagtggca actgctgttt ctggaaaaca gaggtgctgg tgaaggcctg cccaggcggg	480
tacatgtgt accggttga aggcactccc tgggtgtaatc tgagatactg cacagttcca	540
cgagacccat ccatgtgga ggacaagtgt gagaaggcct gccgccccga ggaggagtgc	600
cttgcctca acagcacctg gggctgtttc tgcagacagg acctcaatag ttctgatgtc	660
cacagtttgc agcctcagct agactgtggg cccagggaga tcaaggtaga ggtggacaaa	720
tgtttgctgg gaggcctggg tttgggggag gaggtcattg cctacctgcg agacccaaac	780
tgcagcagca tcttgcagac agaggagagg aactgggtat ctgtgaccag ccccgctccag	840
gctagtgcct gcaggaacat tctggagaga aatcaaacc atgcatcta caaaaacacc	900
ctctccttgg tcaatgattt catcatcaga gacaccatcc tcaacatcaa cttccaatgt	960
gcctaccac tggacatgaa agtcagcctc caagctgcct tgcagcccat tgtaagttcc	1020
ctgaacgtca gtgtggacgg gaatggagag ttcatgtca ggatggcct cttccaagac	1080
cagaactaca cgaatcctta cgaaggggat gcagttgaac tgtctgttga gtccgtgctg	1140
tatgtgggtg ccatcttga acaaggggac acctcccggt ttaacctggt gttgaggaac	1200
tgctatgcca ccccaactga agacaaggct gacctgtga agtatttcat catcagaaac	1260
agctgtcaa atcaacgtga ttccaccatc cacgtggagg agaatgggca gtcctcgga	1320
agccggttct cagttcagat gttcatgttt gctggacatt atgacctagt tttcctgcat	1380
tgtgagattc atctctgtga ttctcttaac gaacagtgcc agccttcttg ctcaagaagt	1440
caagtccgca gtgaagtacc ggccatcgac ctagccggg ttctagattt ggggcccac	1500
actcggagag gtgcacagtc tcccgtgtc atgaatggaa cccctagcac tgcagggttc	1560
ctggtggcct ggcctatggt cctcctgact gtcctcctgg cttggctgtt ctga	1614

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

<400> 6

ES 2 845 150 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc	60
tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgaggttatg gaaaccccat tgaagccagt	120
tcgtatgggc tggacctgga ctgcggagct cctggcacc cagaggctca tgtctgtttt	180
gaccctgtgc agaattacac cctcctggat gaacccttcc gaagcacaga gaactcagca	240
gggtcccagg ggtgcgataa aaacatgagc ggctgggtacc gctttgtagg ggaaggagga	300
gtaaggatgt cggagacctg tgtccagggtg caccgatgcc agacagacgc tcccatgtgg	360
ctgaatggga cccaccctgc ccttggggat ggcacaccca accacactgc ctgtgcccac	420
tggagtggca actgctgttt ctggaaaaca gaggtgctgg tgaaggcctg cccaggcggg	480
taccatgtgt accggttggga aggcactccc tgggtgaatc tgagatactg cacagaccca	540
tccactgtgg aggacaagtg tgagaaggcc tgcgcgcccg aggaggagtg ccttgcctc	600
aacagcacct ggggctgttt ctgcagacag gacctcaata gttctgatgt ccacagtttg	660
cagcctcagc tagactgtgg gccaggag atcaaggatg aggtggacaa atgtttgctg	720
ggaggcctgg gtttggggga ggaggtcatt gcctacctgc gagacccaaa ctgcagcagc	780
atcttgacga cagaggagag gaactgggta tctgtgacca gcccgtcca ggctagtgcc	840
tgcaggaaca ttctggagag aaatcaaacc catgccatct acaaaaacac cctctccttg	900
gtcaatgatt tcatcatcag agacaccatc ctcaacatca acttccaatg tgcctaccca	960
ctggacatga aagtcagcct ccaagctgcc ttgcagccca ttgtaagttc cctgaacgtc	1020
agtgtggacg ggaatggaga gttcattgtc aggatggccc tcttccaaga ccagaactac	1080
acgaatcctt acgaagggga tgcagttgaa ctgtctgttg agtccgtgct gtatgtgggt	1140
gccatcttgg aacaagggga cacctcccgg tttaacctgg tgttgaggaa ctgctatgcc	1200
acccccactg aagacaaggc tgaccttgtg aagtatttca tcatcagaaa cagctgctca	1260
aatcaacgtg attccaccat ccacgtggag gagaatgggc agtcctcgga aagccggttc	1320
tcagttcaga tgttcattgt tgctggacat tatgacctag ttttcctgca ttgtgagatt	1380
catctctgtg attctcttaa tgaacagtgc cagccttctt gctcaagaag tcaagtccgc	1440
agtgaagtac cggccatcga cctagcccgg gttctagatt tggggcccat cactcgga	1500
ggtgcacagt ctcccgtgt catgaatgga acccctagca ctgcagggtt cctggtggcc	1560
tggcctatgg tctcctgac tgtcctcctg gcttggctgt tctga	1605

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

ES 2 845 150 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc	60
tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgagttccac gagacccatc cactgtggag	120
gacaagtgtg agaaggcctg ccgccccgag gaggagtgcc ttgccctcaa cagcacctgg	180
ggctgtttct gcagacagga cctcaatagt tctgatgtcc acagtttgca gcctcagcta	240
gactgtgggc ccaggagat caaggtgaag gtggacaaat gtttgctggg aggcctgggt	300
ttgggggagg aggtcattgc ctacctgcga gacccaaact gcagcagcat cttgcagaca	360
gaggagagga actgggtatc tgtgaccagc cccgtccagg ctagtgctg caggaacatt	420
ctggagagaa atcaaaccga tgccatctac aaaaacaccc tctccttggt caatgatttc	480
atcatcagag acaccatcct caacatcaac ttccaatgtg cctaccact ggacatgaaa	540
gtcagcctcc aagctgcctt gcagcccatt gtaagttccc tgaacgtcag tgtggacggg	600
aatggagagt tcattgtcag gatggccctc ttccaagacc agaactacac gaatccttac	660
gaaggggatg cagttgaact gtctgttgag tccgtgctgt atgtgggtgc catcttgga	720
caaggggaca cctcccgtt taacctggtg ttgaggaact gctatgccac cccactgaa	780
gacaaggctg acctgtgaa gtatttcac atcagaaaca gctgctcaa tcaacgtgat	840
tccaccatcc acgtggagga gaatgggcag tcctcgaaa gccggttctc agttcagatg	900
ttcatgtttg ctggacatta tgacctagtt ttctgcatt gtgagattca tctctgtgat	960
tctcttaatg aacagtgcc gccttcttg tcaagaagtc aagtccgcag tgaagtaccg	1020
gccatcgacc tagcccggt tctagatttg gggcccatca ctcgagagg tgcacagtct	1080
cccggtgtca tgaatggaac ccctagcact gcagggttcc tgggtggcctg gcctatggtc	1140
ctcctgactg tcctcctggc ttggctgttc tga	1173

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

<400> 8

ES 2 845 150 T3

atgcctcacc ttatggaaag gatggtgggc tctggcctcc tgtggctggc cttggtctcc	60
tgcattctga cccaggcatc tgcagtgcag cgagacccat ccactgtgga ggacaagtgt	120
gagaaggcct gccgccccga ggaggagtgc cttgccctca acagcacctg gggctgtttc	180
tgcagacagg acctcaatag ttctgatgtc cacagtttgc agcctcagct agactgtggg	240
cccagggaga tcaaggtgaa ggtggacaaa tgtttgctgg gaggcctggg tttgggggag	300
gaggtcattg cctacctgcg agacccaaac tgcagcagca tcttgacagc agaggagagg	360
aactgggtat ctgtgaccag ccccgctccag gctagtgcct gcaggaacat tctggagaga	420
aatcaaacc atgccatcta caaaaacacc ctctccttgg tcaatgattt catcatcaga	480
gacaccatcc tcaacatcaa cttccaatgt gcctaccac tggacatgaa agtcagcctc	540
caagctgcct tgcagcccat tgtaagttcc ctgaacgtca gtgtggacgg gaatggagag	600
ttcattgtca ggatggccct cttccaagac cagaactaca cgaatcctta cgaaggggat	660
gcagttgaac tgtctgttga gtccgtgctg tatgtgggtg ccatcttgga acaaggggac	720
acctcccggt ttaacctggt gttgaggaac tgctatgcc cccccactga agacaaggct	780
gaccttgtga agtatttcat catcagaaac agctgctcaa atcaacgtga ttccaccatc	840
cacgtggagg agaatgggca gtcctcggaa agccggttct cagttcagat gttcatgttt	900
gctggacatt atgacctagt tttcctgcat tgtgagattc atctctgtga ttctcttaat	960
gaacagtgcc agccttcttg ctcaagaagt caagtccgca gtgaagtacc ggccatcgac	1020
ctagcccggg ttctagattt ggggccccatc actcggagag gtgcacagtc tcccgggtgc	1080
atgaatggaa cccctagcac tgcagggttc ctgggtggcct ggcctatggt cctcctgact	1140
gtcctcctgg cttggctgtt ctga	1164

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de la pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende

- proporcionar una muestra de un sujeto humano que presenta síntomas de enfermedad pancreática, en donde la muestra es una muestra de sangre completa, de plasma o de suero, obteniéndose dicha muestra del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de dichos síntomas,
- proporcionar un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en donde dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b),
- poner en contacto dicha muestra con dicho reactivo de afinidad capturando de ese modo GP2a de dicha muestra, y
- determinar la concentración de GP2a de dicha muestra,

en donde la determinación de una concentración de GP2a en dicha muestra que es mayor que la concentración de GP2a en una o más muestras de control indica la presencia de PA y la ausencia de pancreatitis crónica y cáncer pancreático, y opcionalmente la ausencia de uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

2. Método según la reivindicación anterior, usando un valor umbral de GP2a mayor de 0,2 ng/ml o 0,7 ng/ml.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a) comprende o consiste en una proteína con una secuencia de aminoácidos según los SEQ ID NO 1 o 2.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho reactivo de afinidad es un anticuerpo monoclonal.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método se conduce como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en el que dicho reactivo de afinidad se inmoviliza sobre una superficie sólida antes de ponerse en contacto con dicha muestra.

6. Método según la reivindicación anterior, en el que la determinación de la concentración de GP2a comprende:

- a) capturar GP2a de la muestra por el reactivo de afinidad de GP2a que se inmoviliza en la superficie sólida,
- b) tratar dicha GP2a capturada con un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2,
- c) detectar una señal emitida a partir de dicho reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2, y
- d) comparar la señal obtenida de dicho reactivo de afinidad secundario marcado con la señal de una o más muestras de control de concentración de GP2a predeterminada.

7. Método según la reivindicación anterior, en el que la señal se obtiene de peroxidasa de rábano picante conjugada con el reactivo de afinidad secundario.

8. Kit para el diagnóstico de la pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- a) un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a y una superficie sólida para la inmovilización de dicho reactivo de afinidad, o un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a inmovilizado en una superficie sólida, en donde dicho reactivo de afinidad se une específicamente a GP2a sin unión o unión insignificante a Glicoproteína 2 isoforma beta (GP2b)
- b) un reactivo de afinidad secundario marcado dirigido a GP2 y medios para detectar la señal emitida a partir de dicho marcador, y
- c) programa informático configurado para determinar la concentración de GP2a capturada de una muestra de sangre completa, de plasma o de suero obtenida del sujeto dentro de las 72 horas posteriores a la aparición de los síntomas de enfermedad pancreática por un reactivo de afinidad dirigido contra GP2a, en donde dicho programa informático además está configurado para determinar la concentración de GP2a en dicha muestra usando un valor umbral de 0,7 ng/ml, en donde la determinación de una concentración de GP2a mayor de 0,7 ng/ml en dicha muestra designa la presencia de PA, y la ausencia de pancreatitis crónica y de cáncer de páncreas, y opcionalmente la ausencia de uno o más de cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, tumor neuroendocrino, sarcoma, úlcera péptica o peritonitis.

9. Sistema para el diagnóstico de pancreatitis aguda (PA) en un sujeto mediante la detección de la proteína Glicoproteína 2 isoforma alfa (GP2a), que comprende:

- los componentes del kit a) a c) de la reivindicación 8 y
- un sistema informático para análisis automatizado de una o más muestras, que comprende un dispositivo de procesamiento por ordenador y un lector de placa o una cámara adecuados para detectar la señal del reactivo de

afinidad secundario mercado dirigido a GP2.

Figura 1

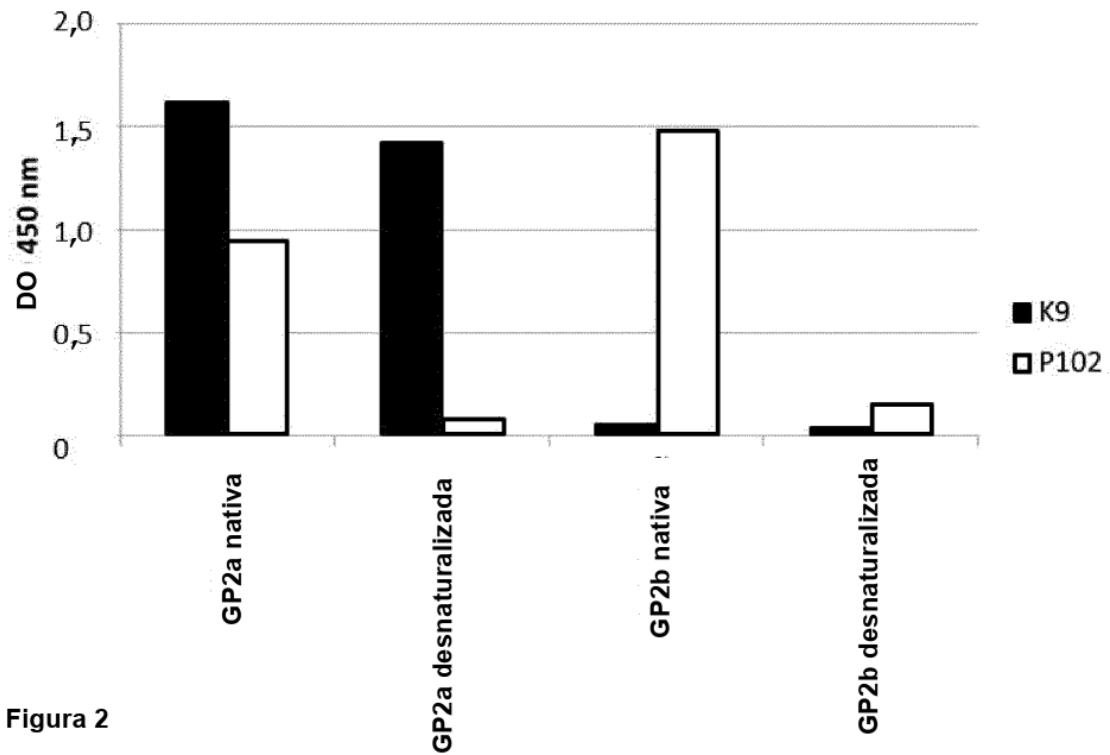


Figura 2

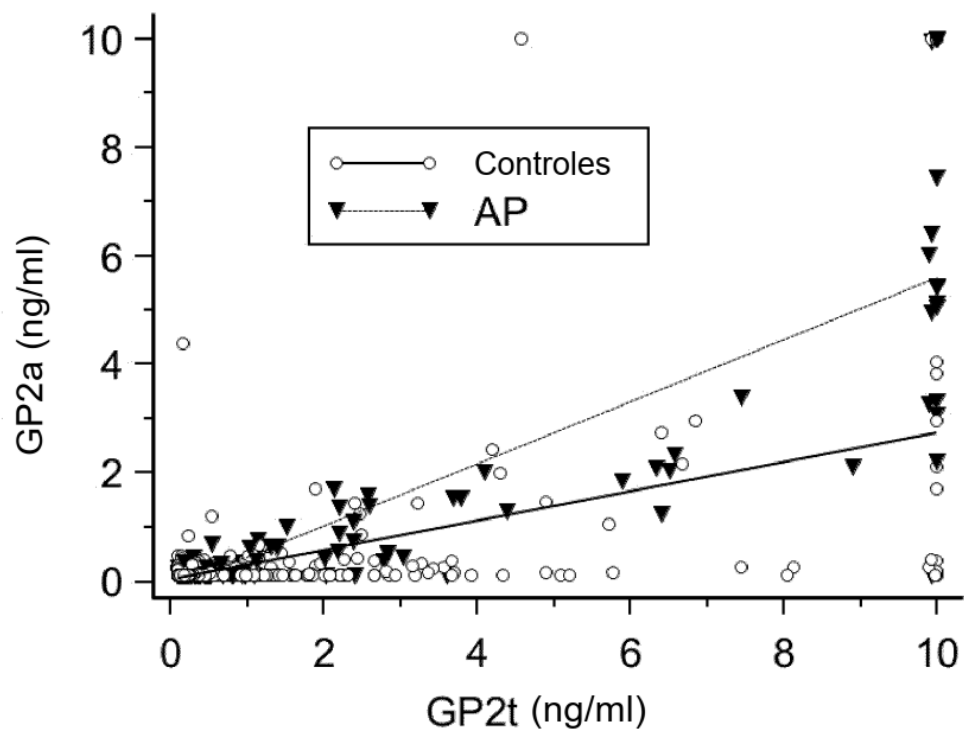


Figura 3

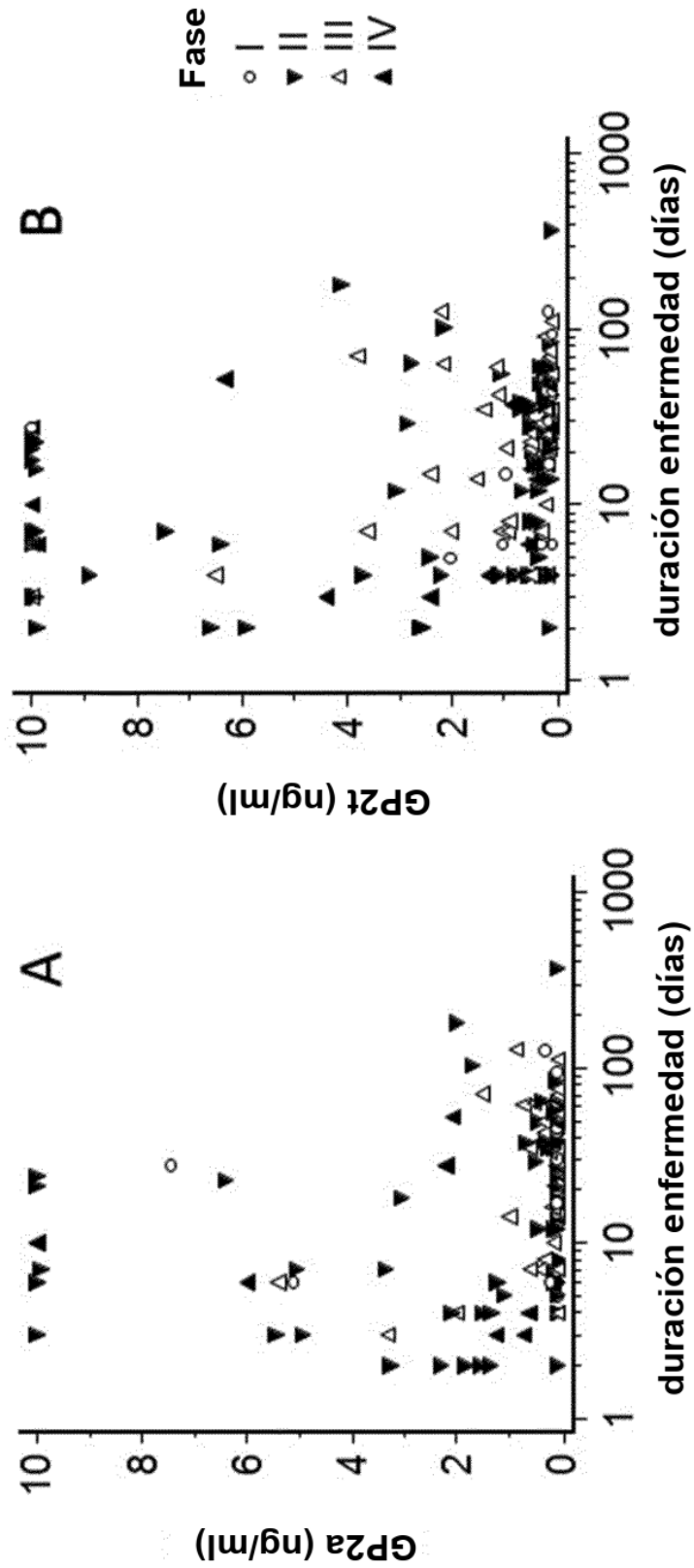


Figura 4

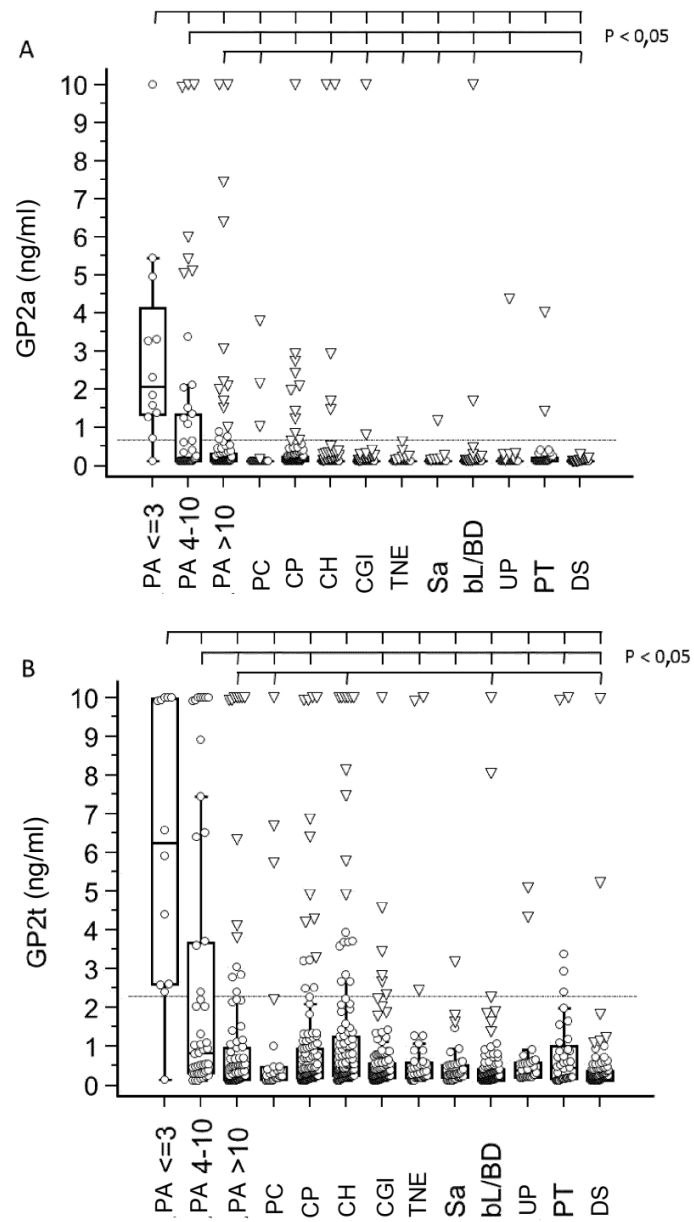


Figura 5

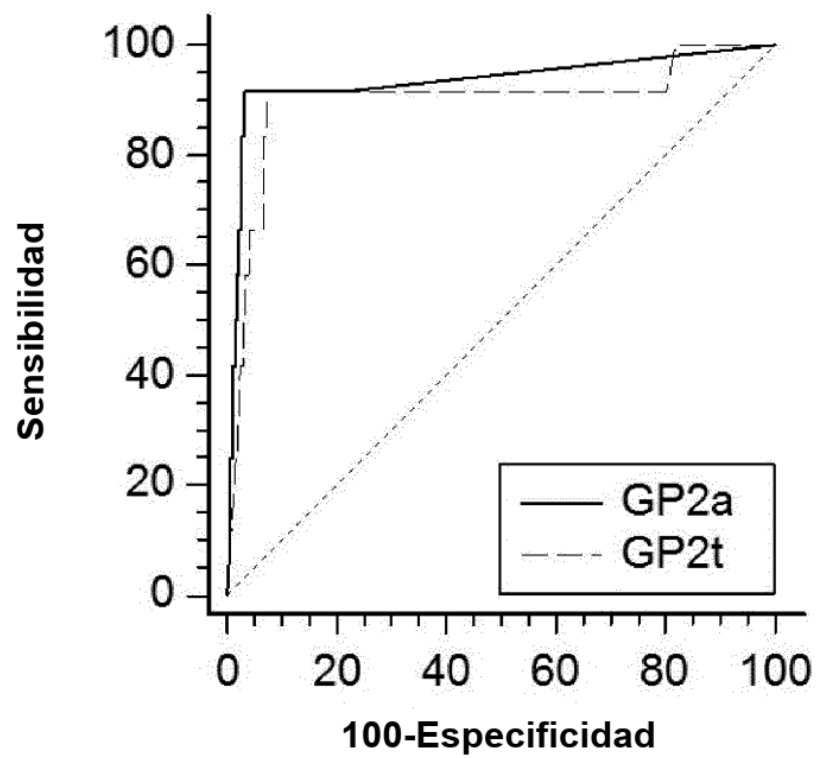


Figura 6

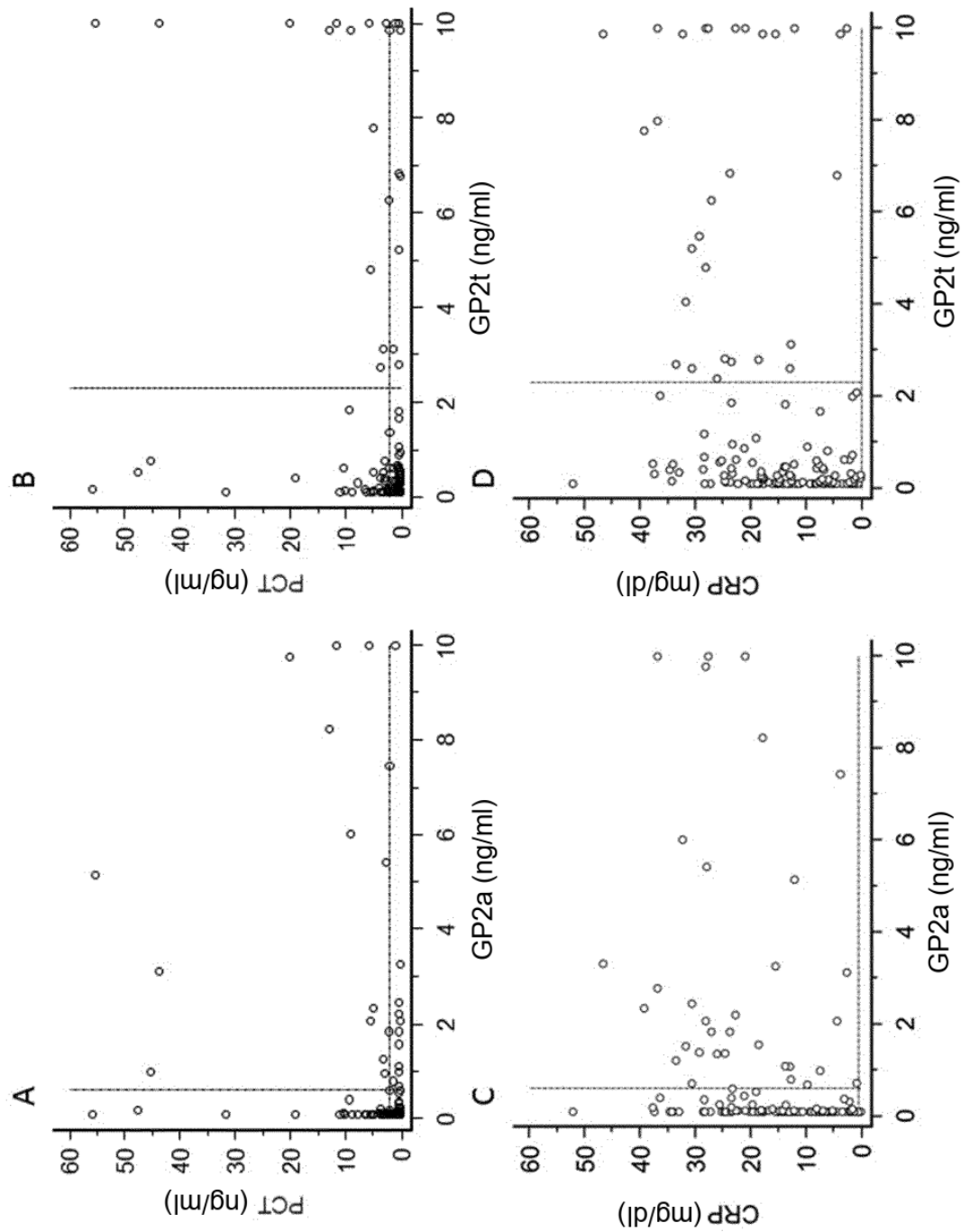


Figura 7 A-D

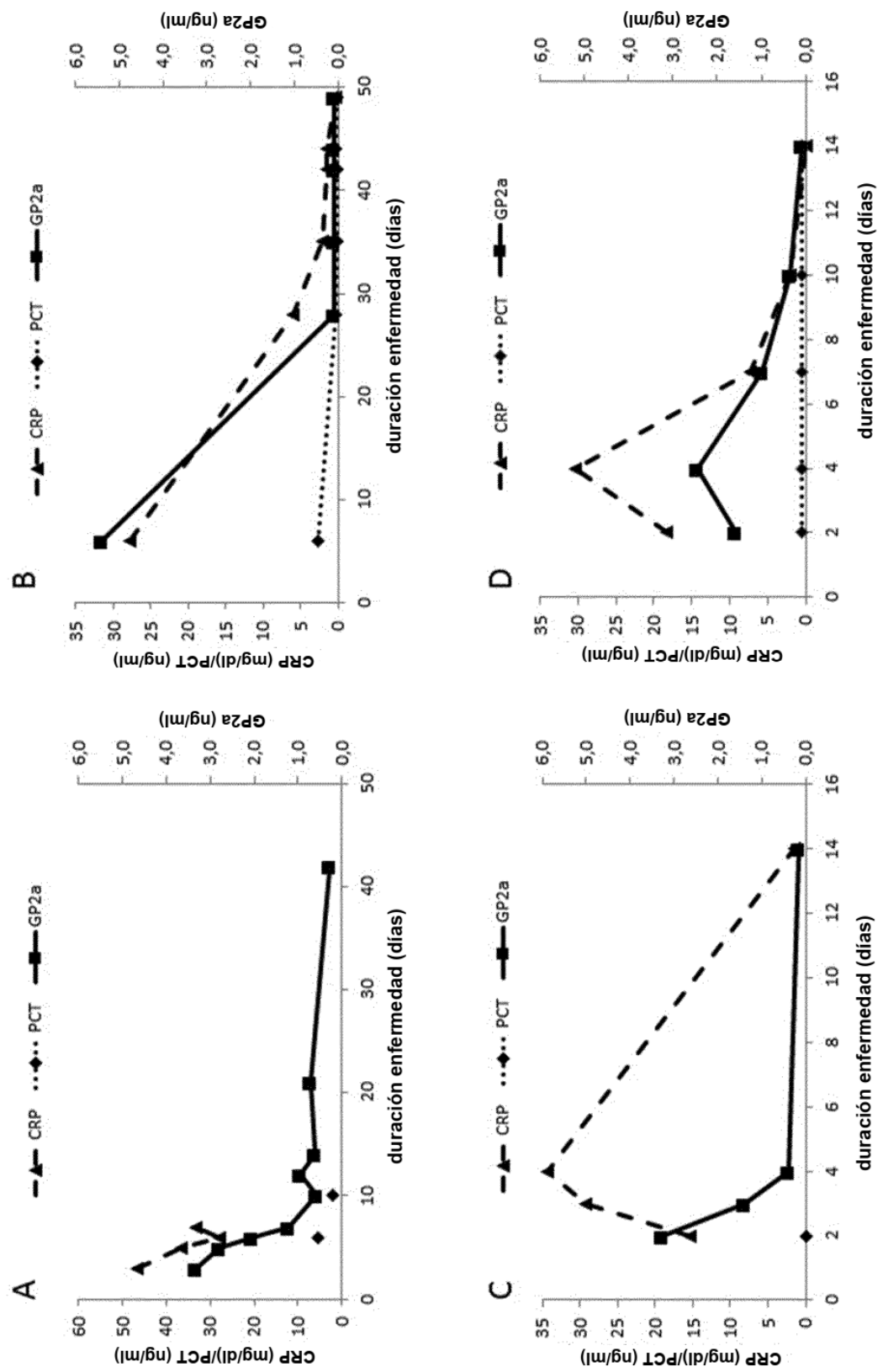


Figura 7 E-H

