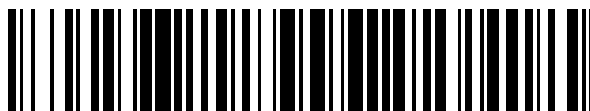


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 845**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/566** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2007** **E 07739308 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2006682**

54 Título: **Diagnosis de enteritis aguda por determinación en sangre de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos**

30 Prioridad:

**22.03.2006 JP 2006079565**

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

**16.09.2014**

73 Titular/es:

**DS PHARMA BIOMEDICAL CO., LTD. (100.0%)**  
**1-43, Esaka-cho 2chome, Suita**  
**Osaka 564-0063, JP**

72 Inventor/es:

**KANDA, TATSUO;**  
**FUJII, HIROSHI;**  
**FUNAOKA, HIROYUKI;**  
**KAJIURA, SATOSHI y**  
**OHKARU, YASUHIKO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 494 845 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

Diagnos de enteritis aguda por determinación en sangre de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos

## Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de determinación y a un reactivo de determinación de enterocolitis aguda.

## Técnica anterior

La enterocolitis aguda es una de las categorías de enfermedad usadas para la inflamación intestinal causada por factores externos tales como virus, bacterias y agentes farmacéuticos. Los síntomas generales de la misma incluyen dolor abdominal y diarrea fuerte, y la enfermedad podría ser fatal dependiendo de la causa.

Por ejemplo, la enterocolitis bacteriana incluye enfermedades infecciosas designadas por ley tal como el cólera y el tifus abdominal, aquellas que se originan a partir de *Escherichia coli* 0157 que induce el envenenamiento de comida, y aquellas causadas por organismos resistentes a fármacos tales como el MRSA. Además, se considera que la enterocolitis vírica con frecuencia es causada por adenovirus, rotavirus, norovirus y similares. En otras palabras, la enterocolitis aguda no es, en un sentido concreto, un nombre de diagnóstico de una enfermedad, sino un término genérico para los síndromes que causan inflamaciones en los intestinos. Clínica y claramente se distingue de la enterocolitis endógena, la cual está causada por antecedentes genéticos, enfermedades autoinmunes y similares.

Casos leves de enterocolitis aguda generalmente se curan por medicación y seguimiento del progreso. Sin embargo, una vez mal diagnosticados, los síntomas progresan y simultáneamente desarrollan peritonitis debido a la perforación gastrointestinal e íleo paralítico, necesitando una operación o produciendo serios síntomas en algunos casos. Por lo tanto, se demanda una diagnosis rápida y exacta.

Para la diagnosis de enterocolitis aguda, se usan: (1) preguntas del médico, (2) examen físico tal como sensibilidad abdominal, cambios enfermizos de la piel, palpación y similares, (3) resultados a partir del examen del laboratorio tal como el análisis de sangre, escatoscopia y similares y (4) examen de imagen tal como rayos X corrientes de abdomen, ultrasonificación, CT, endoscopia, angiografía y similares. Qué métodos entre estos se usan y la combinación de los mismos se dejan mayoritariamente al juicio del clínico en base a la queja principal y en los síntomas clínicos del paciente, y no hay procedimiento diagnóstico definitivo para llegar a una diagnosis confirmada. Para ser preciso, la enterocolitis aguda se juzga de forma exhaustiva no solamente a partir de los síntomas clínicos tales como diarrea y dolor abdominal, sino a partir del examen físico, el examen de laboratorio, el examen de imagen y similares. En cuanto al examen físico entre los anteriormente mencionados, el sitio de inflamación generalmente se puede especificar mediante palpación y sensibilidad abdominal después del comienzo de la peritonitis. Esto requiere técnica y experiencia competente. El cultivo de deposiciones, el cual se usa como examen de laboratorio para identificar bacterias causantes, es inapropiado para determinar el curso del tratamiento para pacientes en la fase aguda ya que el análisis tarda días. Además, CT y endoscopia requieren instalaciones que tengan equipo y técnicos, aunque la exactitud de diagnóstico es relativamente alta, y la endoscopia, que puede especificar con la mayor facilidad el sitio de inflamación y el nivel de gravedad, produce dolor físico y molestias a los pacientes. Por lo tanto, el examen de la endoscopia no es un método de diagnóstico conveniente.

Por lo contrario, el análisis de sangre frecuentemente se usa como una de las herramientas de diagnóstico en situaciones clínicas, ya que minimiza las molestias sobre los pacientes, proporciona diversa información de los pacientes de forma rápida y conveniente, y tiene objetividad como base de diagnosis. Para la diagnosis de enterocolitis aguda, algunas veces se usan como marcadores de diagnóstico el recuento de glóbulos blancos, la proteína C reactiva (CRP, del Inglés "C-Reactive Protein"), deshidrogenasa de ácido láctico (LDH, del Inglés "Lactic Acid Dehydrogenase") y similares. Sin embargo, ya que simplemente permiten la predicción de la presencia de inflamación en el cuerpo sin especificidad a órgano, no pueden ser la base de diagnosis confirmada de enterocolitis aguda. En otras palabras, en la actualidad no existe un marcador de diagnosis en sangre capaz de identificar específica y rápidamente la enterocolitis aguda.

Por lo tanto, hay una demanda de establecimiento de un método de determinación de forma rápida y conveniente de enterocolitis aguda en situaciones clínicas.

La referencia de no-patente 1, la referencia de no-patente 2 y la referencia de no-patente 3 describen que la concentración de proteína de unión a ácido graso intestinal (I-FABP, del Inglés "Intestinal Fatty Acid-Binding Protein") en la sangre del paciente con enfermedad intestinal isquémica aumenta que en gente sana. Además, la referencia de patente 1 y la referencia de patente 2 describen que aumenta la concentración de I-FABP en la sangre del modelo en rata de enfermedad intestinal isquémica.

Sin embargo, en esos casos son solamente observadas las patologías que muestran marcadamente alta concentración de I-FABP en comparación con la de un estado normal, y por lo tanto, no se estableció la relación entre los cambios en la concentración de I-FABP en sangre y la gravedad de la enfermedad. Además, no describen que la concentración de I-FABP en sangre aumente debido al inicio de la enterocolitis aguda.

Aquí, I-FABP es una proteína específica localmente distribuida sobre el epitelio mucoso del intestino delgado, que tiene un pequeño peso molecular, y característicamente presente de forma abundante en la fracción de citoplasma. Además, tiene funciones para unirse a ácidos grasos, y está implicada en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos.

5 Referencia de patente 1: Documento de Patente US N° 5225329.

Referencia de patente 2: documento WO93/08276.

Referencia de no-patente 1: Tatsuo Kanda, Hiroshi Fujii, et al., *Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Is a Useful Diagnostic Marker for Mesenteric Infarction in Humans.*, "Gastroenterology" 1996; 110: p. 339-343.

10 Referencia de no-patente 2: Joshua M. Liberman et al., *Human intestinal fatty acid binding protein: Report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia.*, "Surgery" 1997; 121: N° 3: p. 335-342.

Referencia de no-patente 3: Florian Guthmann et al., *Plasma concentration of intestinal and liver-FABP in neonates suffering from necrotizing enterocolitis and in healthy preterm neonates.*, "Molecular and Cellular Biochemistry" 2002; 239: p. 227-234.

### Descripción de la Invención

15 Problemas a resolver por la Invención

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención proporcionar un método de determinación de forma rápida, conveniente y con exactitud de la enterocolitis aguda basado en un índice cuantitativo y objetivo, y un reactivo para la determinación de la enterocolitis aguda.

Medios de resolver los problemas

20 Los presentes inventores han dirigido intensos estudios en un intento de resolver el problema anteriormente mencionado, y han desarrollado un inmunoensayo con enzima tipo sándwich usando un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano para permitir la detección muy precisa y sensible de I-FABP en sangre. Los presentes inventores midieron la concentración de I-FABP en sangre en modelo experimental en rata de enterocolitis aguda en el sistema de ensayo de I-FABP, y encontraron que la concentración en sangre aumentaba significativamente, en base a lo  
25 cual se aclaró que la concentración de I-FABP en sangre de pacientes de enterocolitis aguda es también alta en casos clínicos humanos.

Además, los presentes inventores han aclarado que la concentración de I-FABP en sangre de pacientes que tienen dolor abdominal o diarrea no diagnosticados como enterocolitis aguda no muestran diferencia en la concentración de I-FABP en sangre de los sujetos sanos. Además, han aclarado que la concentración de I-FABP en sangre muestra  
30 un índice positivo verdadero mayor que CRP y el recuento de glóbulos blancos, los cuales son marcadores diagnósticos existentes de la inflamación en pacientes de enterocolitis aguda. Dado estos resultados y la especificidad a órgano ya que I-FABP está presente solamente sobre el epitelio mucoso del intestino delgado, los presentes inventores han encontrado que la enterocolitis aguda se puede determinar de forma rápida, conveniente y con exactitud midiendo la concentración de I-FABP en sangre, lo cual dio como resultado la finalización de la  
35 presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

(1) Un método de determinación de enterocolitis aguda, que comprende la detección de la proteína de unión a ácido graso intestinal (I-FABP) en la sangre recogida de un mamífero.

(2) El método de (1), el cual usa un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP.

40 (3) El método de (1) ó (2), en donde el mamífero es un humano.

(4) El método de cualquiera de (1) a (3), en donde la I-FABP en la sangre se detecta mediante un método inmunoquímico.

(5) El método de (4), en donde el método inmunoquímico es un método inmunoquímico con enzima, un método de aglutinación en látex o un método de inmunocromatografía.

45 (6) El método de la reivindicación (5), en donde el método inmunoquímico es un método inmunoquímico con enzima.

(7) El método de (6), en donde el método inmunoquímico con enzima es un inmunoensayo con enzima tipo sándwich.

50 (8) El método de cualquiera de (1) a (7), en donde la enterocolitis aguda es una enterocolitis aguda infecciosa o enterocolitis aguda debida a una influencia de un agente farmacéutico.

(9) El uso de un anticuerpo anti-I-FABP para determinar la enterocolitis aguda en un método de acuerdo con (1).

(10) El uso de acuerdo con (9), en donde se usan en combinación un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida y un anticuerpo anti-I-FABP marcado con enzima.

5 (11) El uso de acuerdo con (9) o (10), en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-I-FABP humano.

(12) El uso de acuerdo con cualquiera de (9) a (11), en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

(13) El uso de acuerdo con cualquiera de (9) a (12), en donde la enterocolitis aguda es enterocolitis aguda infecciosa o enterocolitis aguda debida a una influencia de un agente farmacéutico.

#### Efecto de la invención

10 De acuerdo con el método de determinación y el reactivo de determinación de enterocolitis aguda de la presente invención, se puede determinar la enterocolitis aguda de forma rápida y conveniente detectando la I-FABP en sangre, de ese modo se pueden obtener los resultados de determinación objetivos y exactos. Además, haciendo un seguimiento se pueden determinar la concentración en sangre a lo largo del tiempo, el progreso patológico y los efectos del tratamiento sobre la enterocolitis aguda.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra el perfil de la concentración de I-FABP mediante la medición de I-FABP en la sangre de un modelo de experimento en rata de enterocolitis aguda del Ejemplo 2

20 La Figura 2 muestra una curva estándar típica que indica la correlación entre absorbancia y concentración de I-FABP humana mediante un inmunoensayo con enzima que usa un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano del Ejemplo 3.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los cambios (promedio y dispersión) de la concentración de I-FABP en sangre recogida de 29 sujetos sanos a intervalos de 3 meses.

#### El mejor modo de llevar a cabo la Invención

25 El método de determinación de enterocolitis aguda de la presente invención se caracteriza por la detección de I-FABP en sangre. La I-FABP se libera dentro de la sangre desde el epitelio mucoso del intestino delgado de un mamífero. En la presente invención, la sangre a usar puede ser cualquiera de la sangre completa, el suero y el plasma, los cuales se pueden obtener según correspondan tratando, de acuerdo con un método convencional, la sangre tomada de un mamífero. Aquí, la enterocolitis aguda humana se puede determinar cuando la sangre es sangre humana, y la I-FABP es I-FABP humana. En la presente memoria, "la detección de I-FABP" incluye toda  
30 medición cuantitativa de la concentración de I-FABP, medición semicuantitativa de la concentración de I-FABP dentro de un intervalo dado, y detección cualitativa de la presencia o ausencia de I-FABP a una concentración dada o por encima.

El método de detección de I-FABP no se limita a un método particular y, por ejemplo, se pueden emplear métodos inmunoquímicos, diversos métodos de cromatografía tales como el método de HPLC y similares. Particularmente, ya  
35 que la enterocolitis aguda se puede determinar con exactitud detectando la I-FABP en la sangre mediante un método inmunoquímico, es preferible un método inmunoquímico. El método inmunoquímico no se limita a un método particular y, por ejemplo, se pueden usar el método inmunoquímico con enzima, el método de aglutinación en látex, el método de inmunocromatografía, el radioinmunoensayo, el inmunoensayo por fluorescencia, el inmunoensayo por luminiscencia, el inmunoensayo de espín, la turbidimetría, el método de electrodo sensor de enzima, la  
40 inmunoelectroforesis, el método de transferencia tipo Western y similares. De estos, son preferibles el método inmunoquímico con enzima, el método de aglutinación en látex y el método de inmunocromatografía ya que alcanzan alta sensibilidad. Además, el método inmunoquímico con enzima puede ser un método competitivo. Sin embargo, un inmunoensayo con enzima tipo sándwich, el cual es un tipo de método no competitivo, es más preferible ya que la concentración de I-FABP en sangre se puede medir con alta sensibilidad y alta precisión  
45 mediante una fácil operación.

En el inmunoensayo con enzima tipo sándwich, I-FABP se coloca entre dos tipos de anticuerpos que reconocen diferentes epitopos presentes en I-FABP, principalmente, I-FABP está colocado entre un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida y un anticuerpo anti-I-FABP marcado con enzima. A continuación, se mide la cantidad de enzima del anticuerpo marcado unido con la I-FABP para determinar la concentración de I-FABP.

50 Además, como un tipo de inmunoensayo con enzima tipo sándwich, también se puede usar un método que utiliza una reacción de avidina-biotina. De acuerdo con este método, la concentración de I-FABP se mide realizando una reacción anticuerpo antígeno entre la I-FABP atrapada por un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida y anticuerpo anti-I-FABP marcado con biotina, y añadiendo, a continuación, la estreptavidina marcada con enzima a la misma, y midiendo la cantidad de enzima del anticuerpo marcado unido a I-FABP.

El método de aglutinación en látex utiliza una reacción de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas a anticuerpo y antígeno. De acuerdo con este método, se determinó la concentración de I-FABP midiendo el nivel de aglutinación de las partículas de látex producida por una inmunoreacción entre partículas de látex sensibilizadas a anticuerpo anti-I-FABP y I-FABP.

5 En el método de inmunocromatografía, un vehículo similar a lámina que lleva todas las reacciones inmunoquímicas. Ya que este método no requiere un dispositivo de medición especial, es un método ventajoso cuando se necesita una determinación rápida para el juicio fuera del hospital, en una situación de emergencia y similares. Además, este método es adecuado para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de I-FABP a una concentración de no menos de un nivel fijado arbitrariamente, principalmente, un valor límite.

10 En el método de inmunocromatografía, cuando la sangre como muestra se añade gota a gota a un vehículo, la I-FABP en la sangre y un anticuerpo anti-I-FABP marcado con oro coloidal y similar realiza una inmunoreacción para formar un inmunocomplejo. El complejo se desarrolla sobre el vehículo, es atrapado por un anticuerpo anti-I-FABP que reconoce un epítipo diferente, el cual está en fase sólida sobre una región particular del vehículo, y se acumulan las sustancias marcadoras. Mediante observación visual del nivel de acumulación, se mide la  
15 concentración de I-FABP.

El reactivo para determinar la enterocolitis aguda de la presente invención comprende un anticuerpo anti-I-FABP que reconoce y reacciona específicamente con I-FABP, de modo que el método de determinación de enterocolitis aguda de la presente invención se puede practicar mediante un método inmunoquímico. Aunque el anticuerpo anti-I-FABP puede ser un anticuerpo policlonal, más preferiblemente se usa un anticuerpo monoclonal ya que tiene alta  
20 especificidad y puede suministrar de forma estable productos homogéneos. Cuando el objetivo es humano, se usa un anticuerpo anti I-FABP humano. Cuando se usa un anticuerpo monoclonal, es preferible confirmar con antelación que los epítopos del anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida y el anticuerpo anti-I-FABP marcado son diferentes.

El anticuerpo a usar en la presente invención puede estar producido por un método convencional. El anticuerpo policlonal se puede obtener inmunizando animales tales como conejo, ratón, cabra, caballo y similares con I-FABP.  
25 Además, el anticuerpo monoclonal se puede obtener fusionando la célula del bazo de un animal inmunizado con I-FABP y mieloma, clonando las células para seleccionar un hibridoma, y cultivando el hibridoma. La I-FABP como antígeno a usar para producir un anticuerpo anti-I-FABP se obtiene mediante, por ejemplo, purificación a partir de un extracto de un epitelio mucoso de intestino delgado, tal como se describe en Tatsuo Kanda, Teruo Ono et al., *Possible role of rat fatty acid-binding proteins in the intestine as carriers of phenol and phthalate derivatives.*,  
30 "Biochemical and Biophysical Research Communications" 1990; 168: p.1.053-1.058. Sin embargo, también se puede obtener por cultivo celular o tecnología de recombinación genética. Además, también se puede usar como antígeno un péptido de región de I-FABP.

Cuando el reactivo de determinación de la presente invención se basa en un inmunoensayo con enzima tipo sándwich, el anticuerpo anti-I-FABP así obtenido está contenido en el reactivo en forma de un anticuerpo anti-I-FABP marcado con enzima y un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida.  
35

Aquí, aunque la sustancia marcadora para unirse a un anticuerpo anti-I-FABP para dar un anticuerpo anti-I-FABP marcado con enzima no se limita a una particular, se pueden usar enzimas tales como peroxidasa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y similares. Una sustancia marcadora se puede unir a un anticuerpo de acuerdo con un método convencional y usando un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y similares que  
40 tengan.

Un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida puede ser producido mediante la unión de un anticuerpo anti-I-FABP a una fase sólida tal como pocillo de microplaca, perlas de plástico y similares. La unión a una fase sólida generalmente implica disolver un anticuerpo en un tampón adecuado tal como tampón citrato y similares para establecer un contacto entre la superficie de la fase sólida y la disolución del anticuerpo durante un tiempo adecuado (1-2 días).  
45 Además, para suprimir la adsorción no específica y la reacción no específica, una disolución tampón de fosfato, en la cual se disuelve albúmina de suero bovina (BSA, del Inglés "Bovine Serum Albumin"), proteína de leche bovina y similares, se pone en contacto con una fase sólida para bloquear, con las anteriormente mencionadas BSA, proteína de leche bovina y similares, la superficie de la fase sólida donde el anticuerpo no logró cubrir.

El inmunoensayo con enzima y el reactivo del inmunoensayo con enzima usado para detectar I-FABP están descritos en, por ejemplo, Tatsuo Kanda, Hiroshi Fujii, et al., *Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Is a Useful Diagnostic Marker for Mesenteric Infarction in Humans.*, "Gastroenterology" 1996: 110: p. 339-343. Además, los reactivos para un método de inmunocromatografía y método de aglutinación en látex son generales en este campo, y se pueden producir aplicando el anticuerpo anti-I-FABP obtenido tal como se ha mencionado anteriormente a estos reactivos.  
50

Además, midiendo la concentración de I-FABP en sangre mediante, por ejemplo, un método inmunoquímico con enzima usando un anticuerpo anti-I-FABP, se puede diagnosticar objetivamente y con exactitud la enterocolitis aguda, y llega a ser posible la evaluación cuantitativa de la gravedad de la enterocolitis aguda y la evaluación de la progresión patológica a lo largo del tiempo. Para ser específicos, la enterocolitis aguda se diagnostica cuando la  
55

concentración de I-FABP en sangre es mayor de un nivel dado. La gravedad de la enterocolitis aguda está determinada de acuerdo con el nivel dado, y el progreso patológico a lo largo del tiempo se evalúa en base al curso en el tiempo de la concentración de I-FABP.

5 La enterocolitis aguda es un término genérico para los síndromes que causan inflamación intestinal con diarrea y dolor abdominal, e incluye enterocolitis debida a la infección con bacteria, virus y similares, enterocolitis debida a la estimulación fisicoquímica tal como consumo excesivo de alcohol, estimulación por droga y similares. El método de determinación y el reactivo de determinación para la enterocolitis aguda de la presente invención son ampliamente aplicables a la determinación de la enterocolitis aguda que incluye estos síndromes.

10 El reactivo de determinación de la presente invención se proporciona al mercado como un paquete comercial. El paquete comercial de la presente invención contiene el reactivo de determinación anteriormente mencionado de enterocolitis aguda y un material escrito en relación al reactivo, en donde el material escrito y/o el paquete estipulan que el reactivo puede o debería usarse para la determinación de la enterocolitis aguda. Con esta constitución, el uso del reactivo de determinación de la presente invención definitivamente puede ser conocido por el usuario y similares. El paquete adicionalmente puede contener, en un kit, un reactivo usado para la determinación de enterocolitis  
15 aguda, por ejemplo, un tampón utilizable para la dilución, lavado y similares, un reactivo colorante (fluido de sustrato) y similares cuando la determinación se basa en un inmunoensayo con enzima tipo sándwich.

Aunque la presente invención se explica en detalle a continuación mediante la referencia a ejemplos específicos, el alcance técnico de la presente invención no se limita a los ejemplos.

### Ejemplos

#### 20 Ejemplo 1

(A) Obtención de anticuerpo policlonal anti I-FABP de rata en conejo

Se adquirió un anticuerpo policlonal anti-I-FABP de rata mediante el siguiente procedimiento.

25 Se recogió mucosa de intestino delgado de 60 ratas SD (machos) y, después de poner homogénea la extracción con tampón Tris-HCl (0,1 mol/l, pH 7,4, que contenía EDTA 1 mmol/l), se purificó mediante Sephadex G-75, DEAE-celulosa y columna de Hidroxiapatita para dar I-FABP de rata purificada (15 mg). Esto se usó como antígeno para inmunizar un conejo. La cantidad del antígeno usado fue de 100 µg para la primera vez y 50 µg para la segunda vez en adelante, lo cual se puso en suspensión en adyuvante de Freund y se usó. El título ("titer") del anticuerpo de suero de conejo fue confirmado mediante el método de difusión de inmunidad doble en gel, y se recogió la sangre completa y se centrifugó a 3.000 rpm x 10 min para preparar el antisuero.

30 A partir del antisuero obtenido, se pudo obtener un anticuerpo policlonal específico anti-I-FABP de rata mediante cromatografía en Sepharose 6MB usando I-FABP de rata purificada en fase sólida como ligando. Se examinó la reactividad del anticuerpo policlonal obtenido con las fracciones citoplasmáticas del hígado, yeyuno, corazón y estómago preparadas a partir de rata Wistar (macho) mediante análisis por el método de transferencia tipo Western ("Westernblot"). Como resultado, mostró reactividad fuerte con una posición que correspondía a 15 kDa derivada del  
35 yeyuno, mostró reactividad ligera con la misma fracción derivada del estómago, y mostró no reactividad con las fracciones derivadas del hígado y el corazón. Por lo tanto, se demostró que el presente anticuerpo es específico a I-FABP de rata, y no muestra reactividad cruzada con FABP tipo Corazón (H-) y FABP hepática (L-), las cuales son estructuralmente similares.

(B) Inmunoensayo de enzima usando anticuerpo policlonal anti-I-FABP de rata

40 Usando el anticuerpo policlonal anti-I-FABP de rata adquirido en el anteriormente mencionado (A), se midió la concentración de I-FABP en sangre mediante un inmunoensayo con enzima tipo sándwich.

La curva estándar de la medición de I-FABP de rata se dibujó mediante el siguiente procedimiento.

45 Se diluyó la I-FABP de rata purificada apropiadamente para dar disoluciones de I-FABP de rata de diversas concentraciones. Cada una de las disoluciones estándar diluidas se añadió por 100 µl a unos pocillos revestidos de anticuerpo anti-I-FABP de rata en fase sólida, se agitaron en un mezclador, y se incubaron a 37°C durante un tiempo dado. A continuación, se retiró la mezcla de reacción de cada pocillo usando un lavador de ELISA, y cada pocillo se lavó con una disolución de lavado (0,3 ml) preparada diluyendo la disolución de lavado no diluida. La operación de lavado se repitió 3 veces, y la disolución de lavado que quedaba en el pocillo se retiraba con una toallita de papel y similares.

50 Se añadió una disolución (100 µl) de un anticuerpo policlonal anti-I-FABP de rata marcado con peroxidasa de rábano picante a un pocillo de reacción, se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo dado, y se realizó una operación de lavado de la misma manera que anteriormente. Se añadió una disolución de sustrato (100 µl) que contenía o-fenilenodiamina (33 mg/ml), y la mezcla se incubó en un sitio oscuro a temperatura ambiente durante precisamente 15 min. A continuación, se añadió una disolución de parada de reacción (100 µl) que consistía en

ácido sulfúrico 2N y la mezcla se agitó rápidamente en un mezclador para enfriar la reacción de la enzima. Se midió la absorbancia a 492 nm para cada pocillo y se dibujó la curva estándar.

Se demostró de forma reproducible que la absorbancia obtenida por la operación anteriormente mencionada está en una correlación lineal con el valor de I-FABP de rata. Midiendo la absorbancia de la misma manera que anteriormente, se puede determinar con exactitud el valor de I-FABP de rata en las muestras de sangre a partir de la curva estándar.

#### Ejemplo 2

Medición de I-FABP en sangre en modelo experimental en rata de enterocolitis aguda

Se abrió el abdomen de ratas SD (machos) bajo anestesia y se preparó un lazo de ligación del yeyuno (15 cm). Se dividieron en 3 grupos: grupo control (n=8), grupo de *V. cholerae* (n=8) y grupo de *Cl. difficile* (n=8). Se disolvieron la toxina del cólera (30 µg) para el grupo de *V. cholerae* y la toxina Difficile A 5x10<sup>19</sup> CU (de las siglas en Inglés "Cytotoxic Unit"; "Unidad Citotóxica") para el grupo de *Cl. difficile* en disolución salina y se inyectaron en los respectivos lazos. Se recogieron muestras de sangre a 2, 4, 6 y 8 horas después del cierre de la región abdominal, y se midió el nivel de I-FABP en suero mediante un inmunoensayo con enzima tipo sándwich usando el anticuerpo policlonal anti-I-FABP de rata descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados de la medición se muestran en la Figura 1. El nivel de I-FABP en suero era de aproximadamente 10 ng/ml en el grupo control a lo largo del proceso entero. Sin embargo, el nivel de I-FABP aumentó con el tiempo en el grupo de enterocolitis, y el nivel a 8 h fue de 68,2 ng/ml para el grupo de *V. cholerae* y 82,4 ng/ml para el grupo de *Cl. difficile*, mostrando ambos un aumento significativo.

A partir de lo anterior, ya que I-FABP aumenta en modelos experimentales en rata de enterocolitis aguda, se confirmó que la enterocolitis aguda se puede determinar objetivamente mediante la medición de la concentración de I-FABP en sangre.

#### Ejemplo 3

(A-1) Obtención de anticuerpo policlonal anti-I-FABP humano en conejo

Se inmunizó conejo NZW (macho), a intervalos de 2 semanas, con 100 µg/conejo para la primera vez y 50 µg/conejo para la segunda vez en adelante de I-FABP recombinante (rI-FABP) obtenido por la expresión del gen I-FABP humano por baculovirus. Después de la inmunización, se muestreó una alícuota de sangre, y se confirmó el grado de título de anticuerpo con la reactividad con rI-FABP en fase sólida como índice. A continuación, se recogió la sangre completa a partir de la arteria carótida bajo anestesia, y la sangre obtenida se centrifugó a 3.000 rpm x 10 min y se retiró la fracción de célula sanguínea para dar antisuero. El antisuero obtenido se sometió a fraccionamiento por sulfato de amonio, purificación en DEAE-celulosa y purificación por afinidad para dar un anticuerpo policlonal anti-I-FABP humano en conejo.

(A-2) Obtención de anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano de ratón

Se disolvió rI-FABP obtenido por la expresión del gen de I-FABP humano por baculovirus en disolución salina, se puso en suspensión en adyuvante de Freund y se usó. Se inmunizó ratón BALB/c (hembra), a intervalos de 2 semanas, con 100 µg/ratón para la primera vez y 50 µg/ratón para la segunda vez en adelante del mismo. Después de la inmunización, se muestreó una alícuota de sangre, y se confirmó el grado de aumento en el título de anticuerpo a un nivel de antisuero con la reactividad con rI-FABP en fase sólida como índice.

A continuación, se recogieron las células del bazo de un ratón con un título de anticuerpo suficientemente aumentado. Se mezclaron el mieloma de ratón cultivado con antelación y las células del bazo a una relación de 1:2-1:10, y se fusionaron las células mediante el método PEG. Las células fusionadas se sembraron sobre una placa de cultivo mediante un método de dilución límite. A partir de entonces, se cultivaron las células en un incubador de gas de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 7-20 días.

Luego, se recogió el sobrenadante del cultivo de hibridoma, y se confirmó el título con la reactividad con un rI-FABP en fase sólida como índice. Las células clones positivas fueron cultivadas en pases, y se clonaron mediante un método de dilución limitante. Las células obtenidas derivadas de una sola colonia se usaron como hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano.

A continuación, se cultivó a gran escala el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal obtenido. Se administró de manera intraperitoneal Pristano (1 ml) con antelación, y se administraron aproximadamente 5x10<sup>6</sup>-2x10<sup>7</sup> células del hibridoma a un ratón BALB/c (hembra) preliminarmente criado durante no menos de 2 semanas. El ratón se crió durante 10-25 días mientras se aguardaba a la acumulación del fluido ascítico. A partir de entonces, se recogió el fluido ascítico, y el anticuerpo fluido ascítico obtenido se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio, purificación con DEAE-celulosa y purificación de afinidad para dar un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano en ratón.

(B) Inmunoensayo con enzima usando anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano

Usando el kit constituido con los siguientes reactivos, se realizó un inmunoensayo con enzima mediante un inmunoensayo con enzima tipo sándwich. Aunque aquí se use el anticuerpo monoclonal obtenido en el anteriormente mencionado (A-2), en lugar de ello también se puede usar el anticuerpo policlonal obtenido en (A-1). Los contenidos de cada uno de los siguientes reactivos generalmente se usan en el presente campo.

(1) Reactivo estándar: se usan una disolución de proteína que contiene I-FABP preparada de acuerdo con el anteriormente mencionado (A-1) o (A-2), y aquellas preparadas a 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 (ng/ml). Se usa una disolución que tiene la composición idéntica y libre de I-FABP humana como reactivo estándar 0.

(2) Disolución de dilución de muestra: una disolución de proteína que tiene una capacidad de tamponamiento a casi neutro. Esta disolución se usa tal como es.

(3) Pocillo revestido con anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida: un pocillo de microplaca de 96 pocillos hecho de poliestireno, el cual está revestido con anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano. El pocillo se usa tal como es. Un pocillo se usa para una medición.

(4) Reactivo de anticuerpo marcado con enzima: un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano marcado con enzima marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP, del Inglés "Horseradish Peroxidase"), la cual se diluye a una concentración para usarse con una disolución de proteína que tiene una capacidad de tamponamiento a casi neutro y se añade con un conservante y similares. Este reactivo se usa tal como es. Se usa 10 µl de la disolución madre antes de la dilución para una medición.

(5) Disolución de lavado: una disolución que contiene componentes tampón. Se añade un detergente según corresponda para aumentar el efecto del lavado.

(6) Reactivo de sustrato: una disolución que contiene tetrametilbenzidina (TMB). El reactivo de sustrato se usa tal como es. Se usa 100 µl del reactivo de sustrato para una medición.

(7) Disolución de parada de reacción: una disolución que contiene ácido sulfúrico. La disolución se usa tal como es. Se usa 100 µl de la disolución de parada de reacción para una medición.

En primer lugar, se dibujó una curva estándar de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se diluyó apropiadamente un reactivo estándar con una disolución de dilución de muestra para dar disoluciones de I-FABP humana de diversas concentraciones. Se añadió cada una de las disoluciones estándar diluidas por 100 µl a un pocillo de unión a anticuerpo anti-I-FABP humano en fase sólida, se agitó en un mezclador, y se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo dado. A continuación, se retiró la mezcla de reacción de cada pocillo usando un lavador de ELISA, y cada pocillo se lavó con una disolución de lavado (0,3 ml) preparada diluyendo la disolución de lavado no diluida. La operación de lavado se repitió 3 veces, y la disolución de lavado que quedaba en el pocillo se retiró con una toallita de papel y similares.

Se añadió un reactivo de anticuerpo marcado con enzima (100 µl) a un pocillo de reacción, se incubó a temperatura ambiente durante un tiempo dado, y se realizó una operación de lavado de la misma manera que anteriormente. Se añadió un reactivo sustrato (100 µl), y la mezcla se incubó en un sitio oscuro a temperatura ambiente durante precisamente 30 min. A continuación, se añadió una disolución de parada de reacción (100 µl) y la mezcla se agitó rápidamente en un mezclador para enfriar la reacción de la enzima. Se midió la absorbancia a 450 nm para cada pocillo y se dibujó una curva estándar.

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de una curva estándar típica que muestra la correlación entre la absorbancia obtenida por la operación anteriormente mencionada y el valor de I-FABP humana. Midiendo la absorbancia de la misma manera que anteriormente y usando una muestra en lugar del reactivo estándar diluido, se puede determinar con exactitud el valor de I-FABP humana en la muestra dentro del intervalo de 0,1-50 ng/ml a partir de la curva estándar.

De hecho, cuando se diluyeron en serie dos muestras añadidas de I-FABP y el índice de dilución y los valores medidos se trazaron en una gráfica, se obtuvo una línea recta que casi pasaba a través del punto de origen, y la linealidad de la dilución era buena.

Además, se mezclaron dos muestras añadidas de I-FABP y la disolución estándar a una relación dada, y se calculó el índice de recuperación relativo a la concentración de adición. Como resultado, el índice fue casi de 90-110% y el índice de recuperación de la adición era bueno.

Además, tres muestras añadidas de I-FABP se sometieron a un análisis de reproducibilidad de intra-ensayo repitiendo 8 veces. Como resultado, el coeficiente de variación (CV%) fue de 0,9-3,9%. Además, las mismas muestras se sometieron a una reproducibilidad de inter-ensayo repitiendo 4 veces. Como resultado, el coeficiente de variación (CV%) fue de 3,1-4,9%, y la reproducibilidad de los análisis era buena.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los resultados del análisis de la linealidad de la dilución, el índice de recuperación de la adición y la reproducibilidad eran todos buenos, y el inmunoensayo de enzima usando el anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano en el presente ejemplo se confirmó que era altamente fiable.

#### Ejemplo 4

##### 5 Medición de I-FABP en sangre en casos clínicos

Se sacó aproximadamente 1 ml de sangre a los pacientes y se separó el suero. Usando el suero obtenido como muestra, se realizó un inmunoensayo con enzima usando el anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano descrito en el Ejemplo 3. Tal como se muestra en cada uno de los siguientes casos clínicos, la concentración de I-FABP era alta en pacientes de enterocolitis aguda.

10 En casos clínicos, por lo tanto, se puede determinar la enterocolitis aguda de forma objetiva, exacta, rápida y conveniente midiendo la concentración de I-FABP en sangre. Además, la determinación de la progresión patológica y el efecto del tratamiento de la enterocolitis aguda llegan a ser posibles mediante el seguimiento de la concentración en sangre a lo largo del tiempo.

15 El límite de detección de la concentración de I-FABP del suero humano mediante el presente sistema de evaluación es de 0,1 ng/ml, y la concentración de I-FABP de los sujetos sanos en el Ejemplo 5 era alrededor de 1 ng/ml.

20 Por lo contrario, en el experimento animal mostrado en el Ejemplo 2, la concentración del grupo control llegó a ser tan alto como aproximadamente 10 ng/ml. Las razones para esta diferencia se considera que es que la sensibilidad de detección es diferente debido a la diferencia entre anticuerpo policlonal y anticuerpo monoclonal, el intervalo normal puede ser diferente entre humano y rata, está presente una influencia de la laparatomía realizada para preparar un lazo de intestino delgado cerrado en un experimento en rata, y similares.

Además, se ha informado de la concentración en sangre de 20-65 ng/ml de un sujeto sano en Tatsuo Kanda, Hiroshi Fujii, et al., *Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Is a Useful Diagnostic Marker for Mesenteric Infarction in Humans.*, "Gastroenterology" 1996; 110: p. 339-343. La diferencia a partir de los resultados del presente experimento se considera que es atribuible a la diferente sensibilidad de detección debido a la diferencia en anticuerpos, y similares.

##### 25 (1) Caso clínico 1

Una mujer de 78 años de edad. El dolor abdominal surgió por la noche, gradualmente llegó a ser más fuerte, y empezó a acompañar diarrea, vómitos y fiebre. Al día siguiente, se llevó a la paciente al hospital en ambulancia y fue hospitalizada. Por el análisis hecho en el momento de la admisión, se encontraron leucocitos aumentados ( $11.700/\text{mm}^3$ ) y acidosis metabólica suave (BE, -1,9). La diagnosis clínica fue de enterocolitis aguda moderadamente severa, y se realizó la reposición de fluido por goteo en ayunas. Después, los síntomas se resolvieron gradualmente, y se dio a la paciente el alta del hospital 2 días después de la admisión.

30 Cuando se realizó un inmunoensayo con enzima usando un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano el valor de I-FABP en el momento de la admisión fue de 10 ng/ml, y eso en el día del alta fue de 0,8 ng/ml. Ya que los valores de I-FABP de los sujetos sanos están alrededor de 1 ng/ml, se observaron el valor de I-FABP aumentado del suero cuando los síntomas estaban presentes y el cambio de valor que correspondía al perfil del síntoma.

##### (2) Caso clínico 2

40 Una mujer de 56 años de edad. Surgió dolor abdominal y diarrea. Ya que los síntomas no mejoraron, visitó una clínica como paciente externo 2 días después de que surgieran los síntomas. Se encontró no anormalidad excepto un alto valor de CRP (4,67) mediante el análisis de sangre en el momento de la visita como paciente externo. Clínicamente la diagnosis fue de enterocolitis aguda suave, y se prescribieron remedio intestinal y anticonvulsionante. Los síntomas desaparecieron en varios días.

45 Cuando se realizó un inmunoensayo con enzima usando un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano, el valor de I-FABP en el momento de la visita como paciente externo fue de 2,2 ng/ml, lo cual era ligeramente mayor que el de una persona sana (alrededor de 1 ng/ml). El síntoma más suave en comparación con el caso clínico 1 se correlaciona con el grado comparativamente pequeño de aumento en la concentración de I-FABP. De acuerdo con el método de la presente invención, por lo tanto, se pueden conocer con exactitud el progreso patológico y los cambios en el efecto del tratamiento a lo largo del tiempo de la enterocolitis aguda.

#### Ejemplo 5

Relación entre la distribución de I-FABP y el dolor abdominal y diarrea en sujetos sanos

50 Se midieron 59 muestras de suero de voluntarios sanos en un intento de encontrar el intervalo de concentración de I-FABP de sueros en sujetos sanos. Para la selección de los sujetos sanos, se fijaron 6 asuntos como criterios (1. no diabético, 2. función renal normal, 3. no hiperlipidémico, 4. no historia de extirpación de intestino delgado, 5. no enfermedad de intestino delgado activa, y 6. función hepática normal). Además, se dirigió una investigación en el día

de extracción de sangre en cuanto al inicio del dolor abdominal y la diarrea en los 3 días anteriores, y se examinó la influencia de estos síntomas sobre la concentración de I-FABP en sangre. Los 59 voluntarios sanos consistían en 41 hombres (25-50 años de edad,  $37,3 \pm 6,2$  años de edad) y 18 mujeres (28-58 años de edad,  $39,8 \pm 8,1$  años de edad). Entre ellos, los sujetos de ensayo que experimentaron síntomas de dolor abdominal o diarrea en los 3 días anteriores eran de 2 para solo dolor abdominal; 3 para solo diarrea; y 2 para tanto dolor abdominal como diarrea.

Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 5 ml) de los voluntarios sanos, y se obtuvieron fracciones de suero por centrifugación. Se cuantificó la concentración de I-FABP en los sueros obtenidos de la misma manera que en el Ejemplo 4 mediante un inmunoensayo con enzima usando un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano.

En la Tabla 1 se muestran los valores de la medición de I-FABP y la distribución de los mismos en todos los casos incluyendo dolor abdominal y diarrea. Tal como se muestra en la Tabla, la media  $\pm$  S.D. (de sus siglas en Inglés) de la concentración de I-FABP en sangre de las 59 muestras era de  $1,02 \pm 0,53$  ng/ml (macho:  $1,03 \pm 0,53$  ng/ml, hembra:  $0,97 \pm 0,52$  ng/ml). Un estudio estadístico de la influencia del sexo y la edad no reveló ningún factor que hubiera influenciado en la concentración de I-FABP en sangre (Tabla 2).

Tabla 1

Información de los sujetos sanos y las estadísticas de la concentración de I-FABP en sangre

| grupo  | n  | Edad     |      | I-FABP   |      |
|--------|----|----------|------|----------|------|
|        |    | promedio | S.D. | promedio | S.D. |
| total  | 59 | 38,1     | 6,8  | 1,02     | 0,53 |
| hombre | 41 | 37,3     | 6,2  | 1,03     | 0,53 |
| mujer  | 18 | 39,8     | 8,1  | 0,97     | 0,52 |

Tabla 2

Estadísticas relacionadas con la variación de la concentración de I-FABP en sangre por sexo y edad

|       | n  | sexo    |     | edad  |     |
|-------|----|---------|-----|-------|-----|
|       |    | valor p |     | r     |     |
| total | 59 | 0,688   | n.s | 0,151 | n.s |

Luego, se estudió una influencia de los síntomas de dolor abdominal o diarrea sobre la concentración de I-FABP en sangre. Tal como se muestra en la Tabla 3, ninguno mostró una diferencia estadísticamente significativa, y los síntomas de dolor abdominal y diarrea no influían en la concentración de I-FABP en sangre. En otras palabras, se aclaró que la concentración en sangre no cambia en síntomas suaves que no requieren de diagnóstico clínica, tal como el dolor abdominal y similar.

Tabla 3

Estadísticas relacionadas con la variación de la concentración de I-FABP en sangre causada por dolor abdominal y diarrea

|                      | n        | dolor abdominal  |      | diarrea          |      |
|----------------------|----------|------------------|------|------------------|------|
|                      |          | sí               | no   | sí               | no   |
|                      |          | 4                | 55   | 5                | 54   |
| I-FABP               | promedio | 0,84             | 1,03 | 0,92             | 1,02 |
|                      | S.D      | 0,56             | 0,53 | 0,46             | 0,54 |
| Análisis estadístico |          | No significativo |      | No significativo |      |

Por otro lado, se seleccionaron al azar 29 voluntarios a partir de los anteriormente mencionados 59 voluntarios, y se midió la concentración de I-FABP en sangre de nuevo 3 meses después. La variación en los valores medidos de los sujetos de ensayo en ese momento se muestra en la Figura 3. Tal como se muestra en la Figura 3, aunque la concentración en sangre del mismo sujeto de ensayo no era constante todo el tiempo, el intervalo de variación del mismo era pequeño, y no excedió la media  $\pm 2$  S.D. de la concentración en sangre de los sujetos sanos en un intervalo de confianza del 95%.

A partir de lo anterior, se aclaró que la concentración de I-FABP en sangre de una persona sana es en su mayor parte constante sin una influencia de diferencia de sexo y edad, y es de alrededor 1 ng/ml. Además, este valor no cambiaba significativamente en el dolor abdominal y la diarrea del nivel que no se diagnosticó como enterocolitis aguda. Por consiguiente, se aclaró que la enterocolitis aguda se puede diagnosticar con extremadamente exactitud mediante la medición de la concentración de I-FABP en sangre.

Ejemplo 6

Comparación del índice positivo verdadero en pacientes de enterocolitis aguda

En 10 casos clínicamente diagnosticados como enterocolitis aguda, se midió la concentración de I-FABP en suero usando un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP humano. También se midieron para las mismas muestras la proteína C reactiva (CRP) y el recuento de glóbulos blanco (WBC, del Inglés "White Blood Cell Count"), los cuales son marcadores generales de la inflamación, y se comparó la eficacia en la diagnosis de la enterocolitis aguda.

Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 4, mientras el índice positivo verdadero de los marcadores de inflamación convencionales, CRP y WBC, eran del 70% para CRP y 50% para WBC, I-FABP mostraba una sensibilidad de diagnostico extremadamente alta del 90%. El valor estándar (menos de 2,0 ng/ml) usado en este experimento para la diagnosis de I-FABP se calculó a partir del intervalo de confianza del 95% de la concentración de I-FABP en sangre de un sujeto sano mostrado en el Ejemplo 5.

Por consiguiente, se aclaró que la diagnosis de enterocolitis aguda mediante la medición de la concentración de I-FABP en sangre no solamente tiene especificidad de órgano al intestino delgado sino también alta utilidad en comparación con CRP y recuento de glóbulos blancos, lo cual son marcadores generales de diagnosis para la inflamación.

Tabla 4

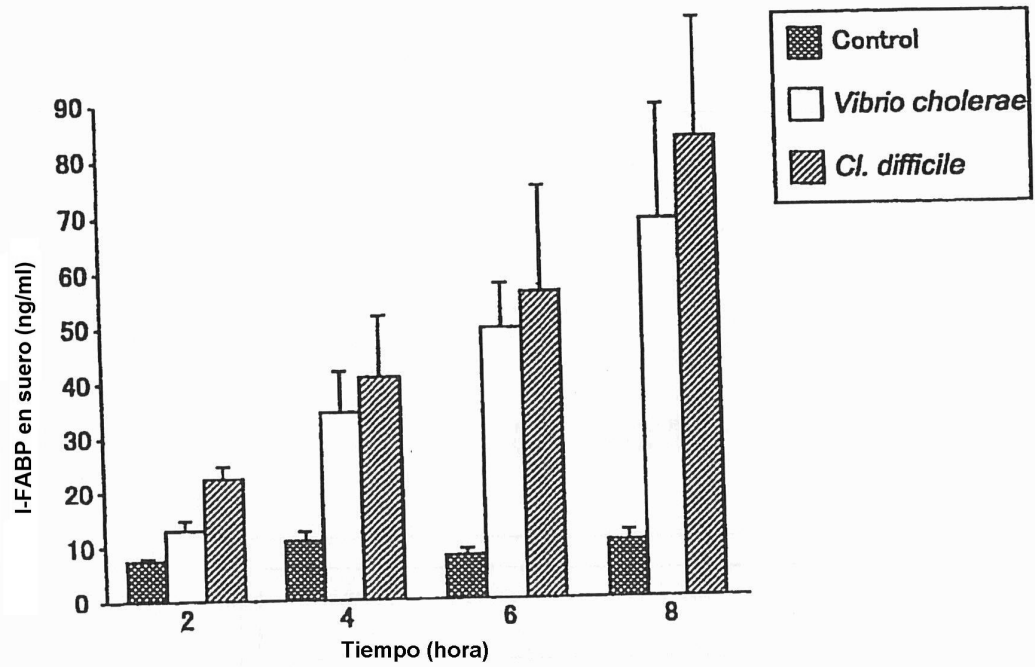
Comparación de la concentración de I-FABP y los marcadores de inflamación en la determinación de enfermedad en casos de enterocolitis aguda

| Nº de caso                | I-FABP (<2,0) |               | CRP (<0,3) |               | WBC (3.500-9.000)   |               |
|---------------------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------------|---------------|
|                           | (ng/ml)       | determinación | (mg/dl)    | determinación | (/mm <sup>3</sup> ) | determinación |
| 1                         | 12,4          | +             | 1,63       | +             | 9.800               | +             |
| 2                         | 11,0          | +             | 0,46       | +             | 11.500              | +             |
| 3                         | 10,0          | +             | 0,44       | +             | 12.700              | +             |
| 4                         | 3,8           | +             | 0,07       | -             | 7.600               | -             |
| 5                         | 3,1           | +             | 0,08       | -             | 3.000               | -             |
| 6                         | 2,7           | +             | 2,37       | +             | 12.600              | +             |
| 7                         | 2,5           | +             | 7,16       | +             | 8.700               | -             |
| 8                         | 2,5           | +             | 5,83       | +             | 8.700               | -             |
| 9                         | 2,1           | +             | 4,19       | +             | 3.700               | -             |
| 10                        | 1,8           | -             | 0,01       | -             | 15.700              | +             |
| Índice positivo verdadero | 90%           |               | 70%        |               | 50%                 |               |

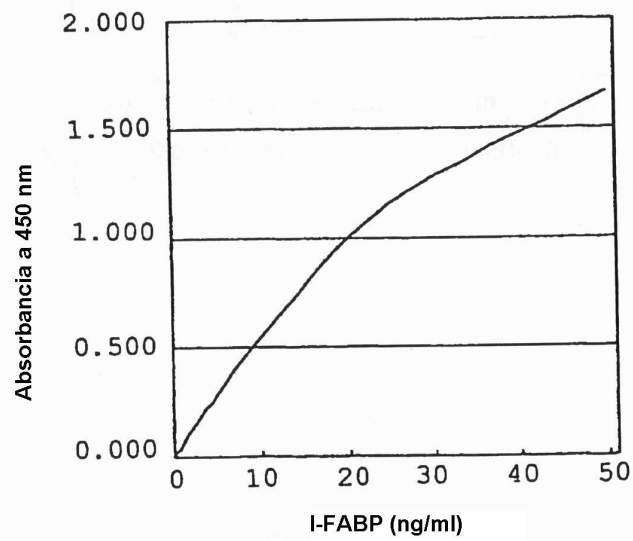
**REIVINDICACIONES**

1. Un método de determinación de enterocolitis aguda, que comprende la detección de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (I-FABP, del Inglés "Intestinal Fatty Acid Binding Protein") en la sangre recogida de un mamífero.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, el cual usa un anticuerpo monoclonal anti-I-FABP.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el mamífero es un humano.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la I-FABP en la sangre se detecta mediante un método inmunoquímico.
- 10 5. El método de la reivindicación 4, en donde el método inmunoquímico es un método inmunoquímico con enzima, un método de aglutinación en látex o un método de inmunocromatografía.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el método inmunoquímico es un método inmunoquímico con enzima.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el método inmunoquímico con enzima es un inmunoensayo con enzima tipo sándwich.
- 15 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enterocolitis aguda es enterocolitis aguda infecciosa o enterocolitis aguda debida a una influencia de un agente farmacéutico.
9. El uso de un anticuerpo anti-I-FABP para determinar la enterocolitis aguda en un método de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde un anticuerpo anti-I-FABP en fase sólida y un anticuerpo anti-I-FABP marcado con enzima se usan en combinación.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-I-FABP humano.
12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 25 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la enterocolitis aguda es enterocolitis aguda infecciosa o enterocolitis aguda debida a una influencia de un agente farmacéutico.

**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

