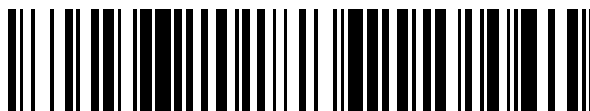


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 616**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2010 E 10792683 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2445517**

54 Título: **Procedimientos de diagnóstico del síndrome del intestino irritable**

30 Prioridad:

**25.06.2009 US 220525 P**

**15.10.2009 US 252094 P**

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

**17.10.2014**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)**

**Avenue Nestlé 55**

**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**GONG, HUA;**

**WANG, SHUI LONG y**

**SINGH, SHARAT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 509 616 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos de diagnóstico del síndrome del intestino irritable

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El síndrome del intestino irritable (SII) es el más común de todos los trastornos gastrointestinales, afectando al 10-20 % de la población general y representando más del 50 % de todos los pacientes con dolencias digestivas. Sin embargo, estudios sugieren que solo aproximadamente del 10 % al 50 % de aquellos afectados con SII buscan en realidad atención médica. Los pacientes con SII presentan síntomas dispares tales como, por ejemplo, dolor abdominal predominantemente relacionado con la defecación, diarrea, estreñimiento o alternando diarrea y estreñimiento, distensión abdominal, gases y excesivo moco en las heces. Más del 40 % de todos los pacientes con SII tienen síntomas tan graves que tienen que ausentarse del trabajo, restringir su vida social, evitar relaciones sexuales, cancelar citas, dejar de viajar, tomar medicación e incluso permanecer confinados en su casa por miedo a la vergüenza. El coste estimado de la asistencia sanitaria del SII en los Estados Unidos es de 8 mil millones de dólares por año (Talley et ál., *Gastroenterol.*, 109:1736-1741 (1995)).

No se comprende bien la patofisiología precisa del SII. Sin embargo, hay una elevada sensibilidad a la percepción de dolor visceral, conocida como sensibilización periférica. Esta sensibilización implica una reducción en el umbral y un aumento en la obtención de los procesos de transducción de neuronas aferentes primarias, atribuible a una variedad de mediadores que incluyen monoaminas (por ejemplo, catecolaminas e indolaminas), sustancia P, y una variedad de citocinas y prostanoïdes tales como prostaglandinas tipo E (véase, por ejemplo, Mayer et ál., *Gastroenterol.*, 107:271-293 (1994)). También participa en la etiopatología del SII la disfunción motora intestinal, que conduce a la manipulación anormal de contenidos intraluminales y/o gas (véase, por ejemplo, Kellow et ál., *Gastroenterol.*, 92:1885-1893 (1987); Levitt et ál., *Ann. Int. Med.*, 124:422-424 (1996)). Los factores psicológicos también pueden contribuir a síntomas del SII apareciendo conjuntamente con, si no son desencadenados por, perturbaciones que incluyen depresión y ansiedad (véase, por ejemplo, Drossman et ál., *Gastroenterol. Int.*, 8:47-90 (1995)).

No se comprenden bien las causas del SII. Las paredes de los intestinos están revestidas con capas de músculo que se contraen y se relajan a medida que mueven la comida del estómago a través del tubo intestinal al recto. Normalmente, estos músculos se contraen y se relajan en un ritmo coordinado. En pacientes con SII, estas contracciones son normalmente más fuertes y duran más de lo normal. Como resultado, la comida es obligada a pasar por los intestinos más rápidamente en algunos casos causando gases, hinchazón y diarrea. En otros casos se produce lo opuesto: el paso de alimentos se ralentiza y las heces se endurecen y secan causando estreñimiento.

Queda por elucidar la patofisiología precisa del SII. Mientras que la dismotilidad intestinal y la percepción visceral alterada se consideran contribuyentes importantes a la patogénesis del síntoma (Quigley, *Scand. J. Gastroenterol.*, 38(Suppl. 237):1-8 (2003); Mayer et ál., *Gastroenterol.*, 122:2032-2048 (2002)), esta afección se ha considerado ahora generalmente como un trastorno del eje cerebro-intestinal. Recientemente también se han propuesto funciones de infección entérica e inflamación intestinal. Estudios han documentado la aparición de SII tras gastroenteritis bacteriológicamente confirmada, mientras que otros han proporcionado pruebas de inflamación de la mucosa de bajo grado (Spiller et ál., *Gut*, 47:804-811 (2000); Dunlop et ál., *Gastroenterol.*, 125:1651-1659 (2003); Cumberland et ál., *Epidemiol. Infect.*, 130:453-460 (2003)) e inunuoactivación (Gwee et ál., *Gut*, 52:523-526 (2003); Pimentel et ál., *Am. J. Gastroenterol.*, 95:3503-3506 (2000)) en SII. La flora entérica también participa, y un estudio reciente demostró la eficacia del organismo probiótico *Bifidobacterium* en el tratamiento del trastorno mediante modulación de la actividad inmune (O'Mahony et ál., *Gastroenterol.*, 128:541-551 (2005)).

El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) es el sistema de estrés endocrino central en los seres humanos (De Wied et ál., *Front. Neuroendocrinol.*, 14:251-302 (1993)) y proporciona una conexión importante entre el cerebro y el sistema inmunitario intestinal. La activación del eje tiene lugar en respuesta a tanto estresantes físicos como psicológicos (Dinan, *Br. J. Psychiatry*, 164:365-371 (1994)), ambos de los cuales participan en la patofisiología del SII (Cumberland et ál., *Epidemiol. Infect.*, 130:453-460 (2003)). Se ha informado que los pacientes con SII tienen una elevada tasa de abuso sexual y físico en la infancia junto con mayores tasas de acontecimientos estresantes de la vida en la adultez (Gaynes et ál., *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 13:437-452 (1999)). Tal traumatismo psicosocial o mala estrategia de afrontamiento cognitivo afecta profundamente la gravedad de los síntomas, el funcionamiento diario y el desenlace de salud.

Aunque la etiología del SII no se ha caracterizado completamente, la comunidad médica ha desarrollado una definición y criterios consenso, conocidos como los criterios de Roma II, para ayudar en el diagnóstico del SII basándose en la historia del paciente. Los criterios de Roma II requieren tres meses de dolor o molestia abdominal continua o recurrente durante un periodo de un año que se alivia por defecación y/o se asocia a un cambio en la frecuencia de defecación o consistencia de las heces, además de dos o más de los siguientes: frecuencia de defecación alterada, forma de las heces alterada, defecación alterada, paso de moco, o hinchazón y distensión abdominal. La ausencia de cualquier trastorno estructural o bioquímico que pudiera estar causando los síntomas también es una afección necesaria. Como resultado, los criterios de Roma II solo pueden usarse cuando hay una

historia del paciente sustancial y es fidedigno solo cuando no hay anatomía intestinal anormal o proceso metabólico que explicara de otro modo los síntomas. Similarmente, los criterios de Roma II desarrollados recientemente por la comunidad médica pueden usarse solo cuando hay presentación de un conjunto específico de síntomas, una historia del paciente detallada y un examen físico.

5 Está bien documentado que el diagnosticar un paciente como que tiene SII puede ser desafiante debido a la similitud en los síntomas entre SII y otras enfermedades o trastornos. En realidad, debido a que los síntomas de SII son similares o idénticos a los síntomas de tantas otras enfermedades intestinales, puede durar años antes de que se haga un diagnóstico correcto. Por ejemplo, los pacientes que tienen enfermedad inflamatoria del intestino (EII), pero  
10 que presentan signos y síntomas leves tales como hinchazón, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal, pueden ser difíciles de distinguir de pacientes con SII. Como resultado, la similitud en los síntomas entre SII y EII dificulta el diagnóstico rápido y preciso. La dificultad en diagnosticar diferencialmente SII y EII obstaculiza el tratamiento temprano y eficaz de estas enfermedades. Desafortunadamente, actualmente no están disponibles procedimientos de diagnóstico rápidos y precisos para distinguir definitivamente el SII de otras enfermedades o trastornos  
15 intestinales que presentan síntomas similares. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

20 La presente invención proporciona procedimientos, ensayos, sistemas y código para clasificar con exactitud si una muestra de un individuo está asociada o no a síndrome del intestino irritable (SII). Como ejemplo no limitante, la presente invención es útil para clasificar una muestra de un individuo como una muestra de SII usando un algoritmo estadístico y/o datos empíricos. Similarmente, la presente invención también proporciona procedimientos, ensayos,  
25 sistemas y código que ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto. La presente invención también es útil para descartar una o más enfermedades o trastornos que presentan síntomas similares al SII y confirmar SII usando una combinación de algoritmos estadísticos y/o datos empíricos. Así, la presente invención proporciona una predicción de diagnóstico precisa de SII e información de pronóstico útil para orientar en las decisiones de tratamiento.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una muestra de sangre o suero del sujeto con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa; y (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una primera muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un primer momento con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -  
40 triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa; (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la primera muestra; (c) poner en contacto una segunda muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un segundo momento con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa; (d) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la segunda muestra; y (e) comparar el nivel de  
45  $\beta$ -triptasa presente en la primera muestra con el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la segunda muestra, en el que un mayor nivel de  $\beta$ -triptasa en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la progresión de SII en el sujeto y un menor nivel de  $\beta$ -triptasa en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la regresión del SII en el sujeto.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una primera muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un primer momento con un resto de unión a histamina en condiciones adecuadas para transformar la histamina presente en la muestra en un complejo que comprende  
55 histamina y el resto de unión a histamina; (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de histamina presente en la primera muestra; (c) poner en contacto una segunda muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un segundo momento con un resto de unión a histamina en condiciones adecuadas para transformar la histamina presente en la muestra en un complejo que comprende histamina y el resto de unión a histamina; (d) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de histamina presente en la segunda muestra; y (e) comparar el nivel de histamina presente en la primera muestra con el nivel de histamina presente en la segunda muestra, en el que un  
60 mayor nivel de histamina en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la progresión de SII en el sujeto y un menor nivel de histamina en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la regresión de SII en el sujeto.

65 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en

contacto una primera muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un primer momento con un resto de unión a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en condiciones adecuadas para transformar la PGE<sub>2</sub> presente en la muestra en un complejo que comprende PGE<sub>2</sub> y el resto de unión a PGE<sub>2</sub>; (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de PGE<sub>2</sub> presente en la primera muestra; (c) poner en contacto una segunda muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un segundo momento con un resto de unión a PGE<sub>2</sub> en condiciones adecuadas para transformar la PGE<sub>2</sub> presente en la muestra en un complejo que comprende PGE<sub>2</sub> y el resto de unión a PGE<sub>2</sub>; (d) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de PGE<sub>2</sub> presente en la segunda muestra; y (e) comparar el nivel de PGE<sub>2</sub> presente en la primera muestra con el nivel de PGE<sub>2</sub> presente en la segunda muestra, en el que un mayor nivel de PGE<sub>2</sub> en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la progresión de SII en el sujeto y un menor nivel de PGE<sub>2</sub> en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la regresión de SII en el sujeto.

En un aspecto, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de suero o de sangre de un sujeto está asociada o no a síndrome del intestino irritable (SII), comprendiendo el código instrucciones para aplicar un procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un diagnóstico

En otro aspecto más, la etapa (a) de la presente invención comprende las etapas de: (a) recubrir una superficie en fase sólida con un primer anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa; (b) poner en contacto la superficie en fase sólida con una muestra de sangre o de suero en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa; (c) poner en contacto la  $\beta$ -triptasa y el complejo de anti- $\beta$ -triptasa con un segundo anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina en condiciones adecuadas para formar un complejo ternario; y (d) poner en contacto el complejo ternario con un sustrato luminiscente de CPSD. Se desvela un procedimiento de clasificación de si una muestra de un individuo está asociada con SII o no, comprendiendo el procedimiento: (a) determinar un perfil de marcadores de diagnóstico detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y (b) clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico.

Se desvelan diversos procedimientos y ensayos de la presente invención, la presencia o nivel de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de los biomarcadores mostrados en la Tabla 1 se detecta para generar un perfil de marcadores de diagnóstico que es útil para predecir SII. En ciertos casos, los biomarcadores descritos en el presente documento se analizan usando un inmunoensayo tal como un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico.

Tabla 1. Marcadores de diagnóstico a modo de ejemplo adecuados para su uso en la clasificación de SII.

Familia	Biomarcador
Citocina	CXCL8/IL-8
	IL-1 $\beta$
	Inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK)
	Leptina
	Osteoprotegerina (OPG)
	CCL19/MIP-3 $\beta$
	CXCL1/GRO1/GRO $\alpha$
	CXCL4/PF-4
	CXCL7/NAP-2
Factor de crecimiento	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
	Factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF)
	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
	Factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF)/anfiregulina
Anticuerpo anti-neutrófilos	Anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos (ANCA)
	Anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos perinucleares (pANCA)
ASCA	ASCA-IgA
	ASCA-IgG
Anticuerpo antimicrobiano	Anticuerpo anti-proteína C de la membrana externa (OmpC)
	Anticuerpo anti-fragelina Cbir-1
Lipocalina	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
MMP	MMP-9
TIMP	TIMP-1

(continuación)

Familia	Biomarcador
Alfa-globulina	Alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-MG)
	Precursor alfa-2 de haptoglobina (Hp $\alpha$ 2)
	Orosomucoide
Proteína de corte de actina	Gelsolina
Proteína S100	Calgranulina A/S100A8/MRP-8
Fibrinopéptido	Fibrinopéptido A (FIBA)
Serina proteasa	Triptasa
Prostaglandina	Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )
Otros	Lactoferrina
	Anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (tTG)
	Péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP)
	Histamina

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 ilustra una curva de respuesta a dosis en una realización de la presente invención.
- La figura 2 ilustra una curva de respuesta a dosis en una realización de la presente invención.
- 10 La figura 3 ilustra una curva patrón en una realización de la presente invención. Se recubrió anti-triptasa humana de conejo sobre una placa de inmunoensayo y se bloqueó con tampón de ensayo (5 % de BSA en PBS). Se añadieron diferentes concentraciones de triptasa humana (curva patrón) o muestras de suero humano (diluidas en tampón de ensayo 1:5 y 1:10) a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a TA. La placa se lavó y se añadió mcAb marcado con fosfatasa alcalina (FA) contra triptasa (G3) y se incubó durante 2 horas a TA. La placa se lavó y se añadió sustrato de FA (CSPD) a cada pocillo. Se usó un lector de placas de luminiscencia para detectar la luz luminiscente.
- 15 Se calculó la concentración de triptasa en suero usando la curva patrón (intervalo de detección de triptasa 0,019-5000 ng/ml. CE<sub>50</sub> = 65 ng/ml; recuperación 81,5 % con 20 ng/ml de triptasa enriquecida en suero reunido normal). Véase el Ejemplo 16.
- 20 La figura 4 ilustra un gráfico de barras con concentraciones de triptasa en suero de control GI, SII-E y SII-D.
- La figura 5 ilustra un gráfico de barras con distribución del valor logarítmico de triptasa.
- La figura 6 ilustra un análisis de densidad para datos de triptasa.
- 25 La figura 7 ilustra un gráfico de barras con concentraciones de triptasa en suero de control GI, SII-E, SII-D y SII-A.
- La figura 8 ilustra la curva de respuesta a dosis de triptasa humana en una realización de la presente invención.
- 30 La figura 9 ilustra la optimización del ELISA de triptasa. (A) Comparación de la curva patrón de triptasa con diferente cantidad de anticuerpo de captura. (B) Optimización de las diluciones de anticuerpo de detección. (C) Comparación de curvas patrón de triptasa en presencia de diferentes cantidades de suero humano normal (SHN).
- La figura 10 ilustra niveles de triptasa en suero de controles sanos (n=139) y de sujetos con SII (n=378).
- 35 La figura 11 ilustra el elevado nivel en suero de histamina y PGE<sub>2</sub> en pacientes con SII frente a controles sanos.
- La figura 12 ilustra una realización de una ruta molecular derivada de marcadores de SII identificados y desvelados en el presente documento.
- 40 La figura 13 ilustra un sistema de clasificación de la enfermedad (SCE) según una realización de la presente invención.
- 45 La publicación de patente de EE. UU. n.<sup>os</sup> 2008/0085524, presentada el 14 de agosto de 2007 y publicada el 10 de abril de 2008; 2008/0166719, presentada el 20 de agosto de 2007, publicada el 10 de julio de 2008, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

### Descripción detallada de la invención

#### I. Introducción

50 El diagnosticar a un paciente síndrome del intestino irritable (SII) puede ser desafiante debido a la similitud en síntomas entre el SII y otras enfermedades o trastornos. Por ejemplo, pacientes que tienen enfermedad inflamatoria

del intestino (EII), pero que presentan signos y síntomas leves tales como hinchazón, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal, pueden ser difíciles de distinguir de pacientes con SII. Como resultado, la similitud en síntomas entre SII y EII dificulta el diagnóstico rápido y preciso y obstaculiza el tratamiento temprano y eficaz de la enfermedad.

5 Aunque la patología del síndrome del intestino irritable (SII) no se entiende completamente, muchos estudios han conducido a la hipótesis de que el SII es un trastorno producido por la desregulación del eje cerebro-intestinal (para revisión véase Ohman y Simrén, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;7(3):163-73). Una observación que respalda esta teoría es el hallazgo repetido de que un elevado número de mastocitos puede encontrarse en la mucosa intestinal de pacientes diagnosticados con SII (Guilarte, M. et ál., *Gut* 56, 203-209 (2007); Walker, M. M. et ál., *Pharmacol. Ther.* 29, 765-773 (2009); Akbar, A. et ál., *Gut* 57, 923-929 (2008); Barbara, G. et ál., *Gastroenterology* 126, 693-702 (2004); Barbara, G. et ál., *Gastroenterology* 132, 26-37 (2007); Cremon, C. et ál., *Am. J. Gastroenterol.* 104, 392-400 (2009); y O'Sullivan, M. et ál., *Neurogastroenterol. Motil.*, 12, 449-457 (2000)). Similarmente, algunos estudios también han encontrado que niveles de mediadores liberados de estas células, que incluyen histamina y serina proteasas (por ejemplo, triptasa), se encuentran en la mucosa colónica de pacientes con SII (Buhner et ál., *Gastroenterology* 2009 Oct;137(4); Barbara et ál., *Gastroenterology*, volumen: 122, número: 4 Supl. 1, página: A-276, abril de 2002). Sin embargo, este hallazgo sigue siendo discutible, ya que otros estudios han informado que no existe tal correlación (Guilarte et ál., *Gut* 2007 Feb;56(2):203-9).

20 Independientemente de la existencia de elevados niveles de mediadores de mastocitos en la mucosa colónica de pacientes con SII, una correlación tal tiene un valor de diagnóstico limitado, ya que las biopsias colónicas son procedimientos invasivos. Aunque los investigadores han buscado patrones similares en la sangre/suero de pacientes con SII, fluidos muy aptos para diagnósticos no invasivos, hasta la fecha no se ha informado de correlación (Lessoif et ál., *Ann Allergy.* 1983 Aug;51(2 Pt 2):249-50; Guilarte, M. et ál., *Gut* 56, 203-209 (2007); Ohman y Simrén, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;7(3):163-73).

25 Ventajosamente, la presente invención proporciona, entre otros aspectos, procedimientos no invasivos y ensayos para el diagnóstico y la clasificación de síndrome del intestino irritable. En ciertas realizaciones, estos procedimientos y ensayos están relacionadas con la detección de la presencia o nivel de concentración de diversos biomarcadores de SII en la sangre y/o suero de sujetos que se sospecha que, o previamente diagnosticados como que, tienen SII. En realizaciones preferidas, los procedimientos comprenden la detección de  $\beta$ -triptasa y/o histamina y/o prostaglandina E<sub>2</sub> en muestras de sangre y de suero de un sujeto. También pueden usarse marcadores adicionales.

35 La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la exactitud de clasificar una muestra biológica de un individuo como una muestra de SII puede mejorarse sustancialmente detectando la presencia o nivel de ciertos marcadores de diagnóstico (por ejemplo,  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina, citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, lactoferrina, etc.), solos o en combinación con identificar la presencia o gravedad de síntomas relacionados con SII basados en la respuesta del individuo a una o más preguntas (por ejemplo, "¿Está sintiendo actualmente algún síntoma?"). La figura 12 muestra un ejemplo no limitante de una ruta molecular derivada de los marcadores de SII identificados y desvelados en el presente documento. En algunos aspectos, la presente invención usa algoritmos estadísticos para ayudar en la clasificación de una muestra como una muestra de SII o muestra sin SII. En otros aspectos, la presente invención usa algoritmos estadísticos para descartar otros trastornos intestinales (por ejemplo, EII), y luego clasificar la muestra sin EII para ayudar en la clasificación de SII.

## 45 II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados asignados a ellos, a menos que se especifique lo contrario.

50 El término "clasificar" incluye "asociar" o "catalogar" una muestra con un estado de enfermedad. En ciertos casos, "clasificar" se basa en pruebas estadísticas, evidencia empírica, o ambos. En ciertas realizaciones, los procedimientos y sistemas de clasificación usan un llamado conjunto de entrenamiento de muestras que tienen estados de enfermedad conocidos. Una vez establecido, el conjunto de datos de entrenamiento sirve de base, modelo o molde con el que se comparan los distintivos de una muestra desconocida con el fin de clasificar el estado de enfermedad desconocido de la muestra. En ciertos casos, el clasificar la muestra está relacionado con diagnosticar el estado de enfermedad de la muestra. En ciertos otros casos, el clasificar la muestra está relacionado con diferenciar el estado de enfermedad de la muestra de otro estado de enfermedad.

60 El término "síndrome del intestino irritable" o "SII" incluye un grupo de trastornos intestinales funcionales caracterizados por uno o más síntomas que incluyen, pero no se limitan a, dolor abdominal, molestia abdominal, cambio en el patrón intestinal, heces sueltas o más frecuentes, diarrea y estreñimiento, normalmente en ausencia de cualquier anomalía estructural evidente. Hay al menos tres formas de SII, dependiendo de qué síntoma predomine: (1) diarrea predominante (SII-D); (2) estreñimiento predominante (SII-E); y (3) SII con patrón de heces alterno (SII-A). El SII también puede producirse en forma de una mezcla de síntomas (SII-M). También hay diversos subtipos clínicos del SII, tales como SII post-infeccioso (SII-PI).

El término “transformar la muestra” incluye un cambio físico y/o químico de la muestra para extraer un marcador o para cambiar o modificar un marcador como se define en el presente documento. Una extracción, una manipulación, una precipitación química, un ELISA, una complejación, una inmuno-extracción, una modificación física o química de la muestra o marcador para medir un nivel o concentración de un marcador constituyen todos una transformación. Mientras que la muestra o marcador no sea idéntico antes y después de la etapa de transformación, el cambio o modificación es una transformación.

El término “muestra” incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un individuo. Muestras adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, excrementos (es decir, heces), lágrimas y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra del intestino delgado o del colon, y extractos celulares de los mismos (por ejemplo, extracto de glóbulos rojos). En una realización preferida, la muestra es una muestra de sangre, plasma o suero. En una realización más preferida, la muestra es una muestra de suero. El uso de muestras tales como suero, saliva y orina es muy conocido 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 pueden diluirse antes del análisis de los niveles de marcador.

El término “biomarcador” o “marcador” incluye cualquier marcador de diagnóstico tal como un marcador bioquímico, marcador serológico, marcador genético, u otra característica clínica o ecográfica que pueda usarse para clasificar una muestra de un individuo como una muestra de SII o para descartar una o más enfermedades o trastornos asociados a síntomas similares al SII en una muestra de un individuo. El término “biomarcador” o “marcador” también engloba cualquier marcador de clasificación tal como un marcador bioquímico, marcador serológico, marcador genético, u otra característica clínica o ecográfica que pueda usarse para clasificar SII en una de sus diversas formas o subtipos clínicos. Ejemplos no limitantes de marcadores de diagnóstico adecuados para su uso en la presente invención se describen a continuación e incluyen citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), alfa-globulinas, proteínas de corte de actina, proteínas S100, fibrinopéptidos, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), taquiquininas, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), serina proteasas (por ejemplo, triptasa, elastasa), prostaglandina (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>), histamina, proteína C reactiva (CRP), lactoferrina, anticuerpos anti-lactoferrina, calprotectina, hemoglobina, NOD2/CARD15, transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano hidroxilasa-1, 5-hidroxitriptamina (5-HT), lactulosa y similares. Ejemplos de marcadores de clasificación incluyen, sin limitación, leptina, SERT, triptófano hidroxilasa-1, 5-HT, proteína 8 de la mucosa antral, queratina-8, claudina-8, zonulina, receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR1), receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR2), triptasa, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y similares. En algunas realizaciones pueden usarse marcadores de diagnóstico para clasificar SII en una de sus diversas formas o subtipos clínicos. En otras realizaciones pueden usarse marcadores de clasificación para clasificar una muestra como una muestra de SII o para descartar una o más enfermedades o trastornos asociados a síntomas similares al SII. Un experto en la materia conocerá marcadores de diagnóstico y de clasificación adicionales adecuados para su uso en la presente invención.

En ciertos casos, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación y ensayos basados en amplificación adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención se describen anteriormente. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Ejemplos no limitantes de inmunoensayos y ensayos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención se describen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “perfil” incluye cualquier conjunto de datos que represente los rasgos distintivos o características asociados a una enfermedad o trastorno tal como SII o EII. El término engloba un “perfil de marcadores de diagnóstico” que analiza uno o más marcadores de diagnóstico en una muestra, un “perfil de síntomas” que identifica uno o más factores clínicos relacionados con SII (es decir, síntomas) que un individuo está experimentando o ha experimentado, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un “perfil de marcadores de diagnóstico” puede incluir un conjunto de datos que representa la presencia o nivel de uno o más marcadores de diagnóstico asociados a SII y/o EII. Asimismo, un “perfil de síntomas” puede incluir un conjunto de datos que representa la presencia, gravedad, frecuencia y/o duración de uno o más síntomas asociados a SII y/o EII.

En algunas realizaciones, un panel para medir uno o más de los marcadores de diagnóstico y/o perfiles de diagnóstico descritos anteriormente puede construirse y usarse para clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII. Un experto en la materia apreciará que la presencia o nivel de una pluralidad de marcadores de diagnóstico puede determinarse simultáneamente o secuencialmente usando, por ejemplo, una alícuota o dilución de la muestra del individuo. En ciertos casos, el nivel de un marcador de diagnóstico particular en la muestra del individuo se considera que es elevado cuando es al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o el 1000 % superior al nivel del mismo marcador en una muestra comparativa (por ejemplo, una muestra

normal, de control GI, de EII y/o de celiaquía) o población de muestras (por ejemplo, superior a una mediana del nivel del mismo marcador en una población comparativa de muestras normales, de control GI, de EII y/o de celiaquía). En ciertos otros casos, el nivel de un marcador de diagnóstico particular en la muestra del individuo se considera que es reducido cuando es al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % inferior al nivel del mismo marcador en una muestra comparativa (por ejemplo, una muestra normal, de control GI, de EII y/o de celiaquía) o población de muestras (por ejemplo, inferior a una mediana del nivel del mismo marcador en una población comparativa de muestras normales, de control GI, de EII y/o celiaquía).

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

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos” incluye una secuencia de aminoácidos que es similar, pero no idéntica a, la secuencia de aminoácidos que se produce naturalmente. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que un péptido, polipéptido o proteína que se produce naturalmente puede tener una o más modificaciones tales como adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos del péptido, polipéptido o proteína que se produce naturalmente, a condición de que la secuencia modificada retenga sustancialmente al menos una actividad biológica del péptido, polipéptido o proteína que se produce naturalmente, tal como inmunorreactividad. La comparación de similitud sustancial entre secuencias de aminoácidos se realiza normalmente con secuencias entre aproximadamente 6 y 100 residuos, preferentemente entre aproximadamente 10 y 100 residuos, y más preferentemente entre aproximadamente 25 y 35 residuos. Una modificación particularmente útil de un péptido, polipéptido o proteína de la presente invención, o un fragmento de los mismos, es una modificación que confiere, por ejemplo, elevada estabilidad. La incorporación de uno o más D-aminoácidos es una modificación útil en aumentar la estabilidad de un polipéptido o fragmento de polipéptido. Similarmente, la deleción o sustitución de residuos de lisina puede aumentar la estabilidad, protegiendo el polipéptido o fragmento de polipéptido de la degradación.

El término “monitorizar la progresión o regresión de SII” incluye el uso de los procedimientos, sistemas y código de la presente invención para determinar el estado de enfermedad (por ejemplo, presencia o gravedad de SII) de un individuo. En ciertos casos, los resultados de un algoritmo (por ejemplo, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos) se comparan con aquellos resultados obtenidos para el mismo individuo en un momento anterior. En algunas realizaciones, los procedimientos, sistemas y código de la presente invención pueden usarse para predecir la progresión de SII, por ejemplo, determinando una probabilidad de que SII progrese tanto rápidamente como lentamente en un individuo basándose en un análisis de marcadores de diagnóstico y/o la identificación de síntomas relacionados con SII. En otras realizaciones, los procedimientos, sistemas y código de la presente invención pueden usarse para predecir la regresión de SII, por ejemplo, determinando una probabilidad de que SII revierta tanto rápidamente como lentamente en un individuo basándose en un análisis de marcadores de diagnóstico y/o la identificación o síntomas relacionados con SII.

El término “monitorizar la eficacia del fármaco en un individuo que recibe un fármaco útil para tratar SII” incluye el uso de los procedimientos, sistemas y código de la presente invención para determinar la eficacia de un agente terapéutico para tratar SII después de que se haya administrado. En ciertos casos, los resultados de un algoritmo (por ejemplo, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos) se comparan con aquellos resultados obtenidos para el mismo individuo antes del inicio del uso del agente terapéutico o en un momento anterior en la terapia. Como se usa en el presente documento, un fármaco útil para tratar SII es cualquier compuesto o fármaco usado para mejorar la salud del individuo e incluye, sin limitación, fármacos para SII tales como agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores de los canales de cloruro, bloqueantes de los canales de cloruro, agonistas de la guanilato ciclase, antibióticos, opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, análogos del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), antagonistas del factor liberador de corticotropina (CRF), probióticos, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

El término “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” incluye una dosis de un fármaco que puede alcanzar un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para tratar SII puede ser la cantidad que puede prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados a SII. La cantidad exacta puede determinarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms*, vol. 1-3 (1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2003)).

### III. Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona procedimientos, sistemas y código para ayudar en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable en un sujeto. Similarmente, la presente invención proporciona procedimientos, sistemas y



código para clasificar con exactitud si una muestra de un individuo está asociada o no a síndrome del intestino irritable (SII). En algunas realizaciones, la presente invención se basa en el uso de un algoritmo estadístico (por ejemplo, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos) y/o datos empíricos (por ejemplo, la presencia o nivel de un marcador de SII). La presente invención también es útil para descartar una o más enfermedades o trastornos que presentan síntomas similares al SII y confirmar SII usando una combinación de algoritmos estadísticos y/o datos empíricos. Por consiguiente, la presente invención proporciona una predicción de diagnóstico precisa de SII e información de pronóstico útil para orientar las decisiones de tratamiento.

#### A. Procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII)

Se desvelan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable en un sujeto determinando el nivel de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de los biomarcadores mostrados en la Tabla 1. En realizaciones preferidas, los procedimientos proporcionados en el presente documento se basan en la detección de al menos un biomarcador seleccionado de  $\beta$ -triptasa, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y una combinación de las mismas.

Se desvelan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable en un sujeto determinando el nivel de al menos un biomarcador seleccionado de  $\beta$ -triptasa, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y una combinación de las mismas, conjuntamente con al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos.

Se desvelan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable en un sujeto determinando el nivel de al menos un biomarcador seleccionado de  $\beta$ -triptasa, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y una combinación de las mismas, conjuntamente con al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en una citocina (por ejemplo, IL-8, IL-1 $\beta$ , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 $\beta$ , GRO $\alpha$ , CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF y/o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA y/o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG y/o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina y/o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo de NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina y/o orosomucoide), proteína de corte de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquinina (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. En todavía otras realizaciones también puede detectarse la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero, gastrina, y una combinación de los mismos.

Se desvela un procedimiento de clasificación de si una muestra de un individuo está asociada o no a SII, comprendiendo el procedimiento: (a) determinar un perfil de marcadores de diagnóstico detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; (b) clasificar la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII usando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcadores de diagnóstico; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, (c) clasificar la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en el mismo perfil de marcadores de diagnóstico como se ha determinado en la etapa (a) o un perfil de marcadores de diagnóstico diferente.

Los marcadores de diagnóstico usados para descartar EII pueden ser los mismos que los marcadores de diagnóstico usados para confirmar SII. Alternativamente, los marcadores de diagnóstico usados para descartar EII pueden ser diferentes de los marcadores de diagnóstico usados para confirmar SII.

Se desvela un procedimiento de descartar primero EII (es decir, clasificar la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII) y luego confirmar SII (es decir, clasificar la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII) que comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; clasificar la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII usando un primer algoritmo estadístico basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, clasificar la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII usando un segundo algoritmo estadístico basado en los mismos perfiles que se han determinado en la etapa (a) o perfiles diferentes. Un experto en la materia apreciará que el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas pueden determinarse simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

El procedimiento puede comprender además descartar inflamación intestinal. Ejemplos no limitantes de inflamación intestinal incluyen inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis con bolsa ileoanal, colitis microscópica, diarrea infecciosa y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la inflamación intestinal se descarta basándose en la presencia o nivel de proteína C reactiva (CRP), lactoferrina, calprotectina, o combinaciones de las mismas.

Como se describe en el presente documento, los procedimientos pueden comprender además enviar los resultados de la clasificación de SII a un profesional clínico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general. Los procedimientos también pueden proporcionar un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII. Por ejemplo, el individuo pueden tener aproximadamente una probabilidad del 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o superior, de tener SII. En algunos casos, los procedimientos proporcionan adicionalmente un pronóstico de SII en el individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser cirugía, desarrollo de una categoría o subtipo clínico de SII, desarrollo de uno o más síntomas, o recuperación de la enfermedad.

### 1. $\beta$ -triptasa

En un aspecto se proporciona un procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una muestra de sangre o de suero del sujeto con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa; y (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra. En una realización, el procedimiento comprende además: (c) comparar el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con un nivel de control, en el que una diferencia en el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII.

En una realización específica, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene  $\beta$ -triptasa contenida en ella en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra.

En ciertas realizaciones, un nivel de control es el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o un nivel promedio de  $\beta$ -triptasa presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos sanos. En otras realizaciones, un nivel de control es el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sin SII o un nivel promedio de  $\beta$ -triptasa presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos no SII. En otra realización, un nivel de control es el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto enfermo o un nivel promedio de  $\beta$ -triptasa presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos enfermos. Ejemplos no limitantes de sujetos enfermos que son útiles para determinar un nivel de control incluyen sujetos con SII, sujetos con una enfermedad gastrointestinal no SII, sujetos con enfermedad inflamatoria del intestino (EII), sujetos con colitis ulcerosa (CU), sujetos con enfermedad de Crohn (EC), sujetos con celiaquía, sujetos con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), sujetos con cáncer, sujetos con un cáncer del tubo gastrointestinal, sujetos con un cáncer del estómago, sujetos con un cáncer del intestino delgado o grueso, y similares.

En casos en los que el nivel de control es un nivel de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o sujetos sanos, un elevado nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos sanos, un nivel similar o reducido de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

En casos en los que el nivel de control es un nivel de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero de un sujeto o sujetos con SII, un nivel similar o elevado de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos con SII, un nivel reducido de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

En ciertos aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador en sangre o suero adicional seleccionado de histamina y prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ). En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa e histamina de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otra realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa y  $PGE_2$  de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En una tercera realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa, histamina y  $PGE_2$  de una muestra de sangre o de suero de

un sujeto. Preferentemente, la  $\beta$ -triptasa, histamina y/o  $PGE_2$  se detectan de la misma muestra de sangre o de suero, aunque en ciertos casos los biomarcadores pueden detectarse en diferentes muestras de sangre o de suero tomadas del mismo individuo, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en ensayos separados realizados con diferentes alícuotas de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otras realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en un ensayo de detección de un único múltiplex, por ejemplo, en un ensayo Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>.

En todavía otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador adicional seleccionado de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ), interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, al menos 2 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse. En otras realizaciones, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse.

La muestra usada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es normalmente sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, excrementos (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra del intestino delgado o del colon. Preferentemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los procedimientos de la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra. En una realización preferida, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de sangre o de suero. En otras realizaciones, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de una muestra biológica. En una realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) de una muestra biológica. En una realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero e inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero e interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, la interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero e inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra

de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

5 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

10 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

20 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

25 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra biológica. En una realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

30 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero y todos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra de sangre o de suero, una muestra de heces, o una biopsia del intestino del sujeto.

40 En ciertas realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, transferencia Northern, transferencia puntual, protección de RNasa, y una combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un ensayo basado en amplificación adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

45 En ciertas otras realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Un ejemplo no limitante de un inmunoensayo adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunofluorescencia tales como ensayos de anticuerpos fluorescentes directos, ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), ensayos de anti-inmunofluorescencia del complemento y ensayos de inmunofluorescencia de avidina-biotina. Otros tipos de ensayos inmunohistoquímicos incluyen ensayos de inmunoperoxidasa.

50 En una realización preferida, la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa se determina usando un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de sándwich. Puede usarse cualquier par de anticuerpos adecuado para los anticuerpos de captura y de detección en un ELISA de sándwich. Un experto en la materia sabrá y apreciará cómo seleccionar un par de anticuerpos apropiado para el ensayo. Generalmente, se seleccionan dos anticuerpos que se unen a la diana de interés, por ejemplo,  $\beta$ -triptasa, en diferentes epítopes de forma que la unión del primer anticuerpo (de captura) no interfiera con el segundo anticuerpo (de detección). En ciertas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjugará con una enzima, por ejemplo, fosfatasa alcalina, para ayudar en la detección del complejo. En otras realizaciones, un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), que se une al anticuerpo de detección, puede usarse en el ensayo. Generalmente, el complejo se detectará entonces por el uso de un sustrato luminiscente, por ejemplo, Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pico

Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.13.7]decan}-4-il)fenilfosfato de sodio; Tropix, Inc). En una realización preferida, el ELISA de sándwich de  $\beta$ -triptasa comprende el uso de un anticuerpo anti-triptasa conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo de detección y un sustrato luminiscente que contiene CPSD para potenciar la sensibilidad del ensayo. El sustrato CPSD puede encontrarse en sistemas de detección quimioluminiscente, tales como el sistema ELISA-Light™ (Applied Biosystems). En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de detección usado en el ELISA de sándwich es el anticuerpo anti-triptasa G3 (sc-33676; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA).

En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente la etapa de determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto. En una realización preferida, el procedimiento comprende: (d) determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto; y (e) diagnosticar el sujeto como que tiene SII o que no tiene SII usando un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII y el perfil del sistema. En una realización preferida, el procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico, por ejemplo, para  $\beta$ -triptasa o una combinación de la misma como se describe en el presente documento, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

El perfil de síntomas se determina normalmente identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia, y combinaciones de los mismos.

En realizaciones preferidas se identifica que la presencia o gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los síntomas descritos en el presente documento, genera un perfil de síntomas que es útil para predecir SII. En ciertos casos se usa un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, oral o telefónica para producir el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta normalmente comprende un conjunto normalizado de preguntas y respuestas con el fin de obtener información de los encuestados en relación con sus síntomas relacionados con SII actuales y/o recientes.

En algunas realizaciones, el perfil de síntomas se produce recopilando y/o analizando todas o un subconjunto de las respuestas a las preguntas planteadas en el cuestionario o encuesta. En otras realizaciones, el perfil de síntomas se produce basándose en la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está actualmente sintiendo algún síntoma?" El perfil de síntomas generado según cualquiera de estas realizaciones puede usarse en combinación con un perfil de marcadores de diagnóstico en los procedimientos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de predecir SII.

En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que un sujeto tenga SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que el sujeto tenga SII. En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos que incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que una muestra clasificada como una muestra de SII o una muestra sin SII sea de un sujeto con SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que la muestra sea de un sujeto que tiene SII.

En otras realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente clasificar un diagnóstico de SII como SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI). En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos en el presente documento para clasificar adicionalmente una muestra como muestra de SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI).

En una realización, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en la diferenciación de SII-D y SII-A de SII-E, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene  $\beta$ -triptasa contenida en ella en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra.

En algunos casos, el ensayo para ayudar en la diferenciación de SII-D y SII-A de SII-E comprende además detectar la presencia o nivel de una prostaglandina (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>); y/o histamina en la muestra.

En todavía otras realizaciones, procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente

5 diagnosticar un sujeto que no tiene SII como que tiene EII, como que no tiene EII, como que tiene celiaquía, como que no tiene celiaquía, como que es un sujeto sano, o como que no tiene una enfermedad gastrointestinal. En una realización relacionada se proporcionan procedimientos en el presente documento que clasifican adicionalmente una muestra sin SII como una muestra de EII, una muestra sin EII, una muestra sana, una muestra de enfermedad no

10 En una realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden el uso de un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII. En ciertas realizaciones, el algoritmo se basa adicionalmente en el perfil del sistema. En una realización preferida, el algoritmo comprende un algoritmo estadístico, por ejemplo, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos. En una realización más preferida, el algoritmo comprende una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. En una realización más preferida, la combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende un clasificador de bosques aleatorios y un clasificador de redes neuronales. Transformar la histamina presente en la muestra en un complejo que comprende histamina y el resto de unión a histamina; y (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de histamina presente en la muestra. En una realización, el procedimiento comprende además: (c) comparar el nivel de histamina presente en la muestra con un nivel de control, en el que una diferencia en el nivel de histamina presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativa de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII.

20 En una realización específica, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene histamina contenida en ella en condiciones adecuadas para transformar la histamina en un complejo que comprende histamina y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de histamina en la muestra.

30 En ciertas realizaciones, un nivel de control es el nivel de histamina presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o un nivel promedio de histamina presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos sanos. En otras realizaciones, un nivel de control es el nivel de histamina presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sin SII o un nivel promedio de histamina presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos no SII. En otra realización, un nivel de control es el nivel de histamina presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto enfermo o un nivel promedio de histamina presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos enfermos. Ejemplos no limitantes de sujetos enfermos que son útiles para determinar un nivel de control incluyen sujetos con SII, sujetos con una enfermedad gastrointestinal no SII, sujetos con enfermedad inflamatoria del intestino (EII), sujetos con colitis ulcerosa (CU), sujetos con enfermedad de Crohn (EC), sujetos con celiaquía, sujetos con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), sujetos con cáncer, sujetos con un cáncer del tubo gastrointestinal, sujetos con un cáncer del estómago, sujetos con un cáncer del intestino delgado o grueso, y similares.

40 En casos en los que el nivel de control es un nivel de histamina en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o sujetos sanos, un elevado nivel de histamina presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos sanos, un nivel similar o reducido de histamina presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

45 En casos en los que el nivel de control es un nivel de histamina en una muestra de sangre o de suero de un sujeto o sujetos con SII, un nivel similar o elevado de histamina presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos con SII, un nivel reducido de histamina presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

50 En ciertos aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de histamina en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador en sangre o suero adicional seleccionado de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y  $\beta$ -triptasa. En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina y prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otra realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina y  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En una tercera realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y  $\beta$ -triptasa de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. Preferentemente, la histamina, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y/o  $\beta$ -triptasa se detectan de la misma muestra de sangre o de suero, aunque en ciertos casos los biomarcadores pueden detectarse en diferentes muestras de sangre o de suero tomadas del mismo individuo, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en ensayos separados realizados con diferentes alícuotas de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otras realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en un ensayo de detección de un único múltiplex, por ejemplo, en un ensayo Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>.

En todavía otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de histamina en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador adicional seleccionado de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, al menos 2 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse. En otras realizaciones, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse.

La muestra usada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es normalmente sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, excrementos (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra del intestino delgado o del colon. Preferentemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los procedimientos de la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra. En una realización preferida, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de sangre o de suero. En otras realizaciones, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de una muestra biológica. En una realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) de una muestra biológica. En una realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero e inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero e inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se

detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

5 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

10 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

15 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra biológica. En una realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

20 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de histamina de una muestra de sangre o de suero y todos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra de sangre o de suero, una muestra de heces, o una biopsia del intestino del sujeto.

25 En ciertas realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, transferencia Northern, transferencia puntual, protección de RNasa, y una combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un ensayo basado en amplificación adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

30 En ciertas otras realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Un ejemplo no limitante de un inmunoensayo adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunofluorescencia tales como ensayos de anticuerpos fluorescentes directos, ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), ensayos de anti-inmunofluorescencia del complemento y ensayos de inmunofluorescencia de avidina-biotina. Otros tipos de ensayos inmunohistoquímicos incluyen ensayos de inmunoperoxidasa.

35 En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente la etapa de determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto. En una realización preferida, el procedimiento comprende: (d) determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto; y (e) diagnosticar el sujeto como que tiene SII o que no tiene SII usando un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII y el perfil del sistema. En una realización preferida, el procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico, por ejemplo, para histamina o una combinación de la misma como se describe en el presente documento, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

40 El perfil de síntomas se determina normalmente identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia, y combinaciones de los mismos.



En realizaciones preferidas se identifica que la presencia o gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los síntomas descritos en el presente documento, genera un perfil de síntomas que es útil para predecir SII. En ciertos casos se usa un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, oral o telefónica para producir el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta normalmente comprende un conjunto normalizado de preguntas y respuestas con el fin de obtener información de los encuestados en relación con sus síntomas relacionados con SII actuales y/o recientes.

En algunas realizaciones, el perfil de síntomas se produce recopilando y/o analizando todas o un subconjunto de las respuestas a las preguntas planteadas en el cuestionario o encuesta. En otras realizaciones, el perfil de síntomas se produce basándose en la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está actualmente sintiendo algún síntoma?" El perfil de síntomas generado según cualquiera de estas realizaciones puede usarse en combinación con un perfil de marcadores de diagnóstico en los procedimientos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de predecir SII.

En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que un sujeto tenga SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que el sujeto tenga SII. En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos que incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que una muestra clasificada como una muestra de SII o una muestra sin SII sea de un sujeto con SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que la muestra sea de un sujeto que tiene SII.

En otras realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente clasificar un diagnóstico de SII como SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI). En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos en el presente documento para clasificar adicionalmente una muestra como una muestra de SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI).

En una realización, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en la diferenciación de SII-D y SII-A de SII-E, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene histamina contenida en ella en condiciones adecuadas para transformar la histamina en un complejo que comprende histamina y un anticuerpo anti-histamina de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de histamina en la muestra.

En algunos casos, el ensayo para ayudar en la diferenciación de SII-D y SII-A de SII-E comprende además detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa; y/o prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) en la muestra.

En todavía otras realizaciones, procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente diagnosticar un sujeto que no tiene SII como que tiene EII, como que no tiene EII, como que tiene celiaquía, como que no tiene celiaquía, como que es un sujeto sano, o como que no tiene una enfermedad gastrointestinal. En una realización relacionada se proporcionan procedimientos en el presente documento que clasifican adicionalmente una muestra sin SII como una muestra de EII, una muestra sin EII, una muestra sana, una muestra de enfermedad no gastrointestinal, una muestra celíaca, y similares.

En una realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden el uso de un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII. En ciertas realizaciones, el algoritmo se basa adicionalmente en el perfil del sistema. En una realización preferida, el algoritmo comprende un algoritmo estadístico, por ejemplo, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos. En una realización más preferida, el algoritmo comprende una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. En una realización más preferida, la combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende un clasificador de bosques aleatorios y un clasificador de redes neuronales.

### 3. Prostaglandina $E_2$ ( $PGE_2$ )

En un aspecto específico se proporciona un procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una muestra de sangre o de suero del sujeto con un resto de unión a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) en condiciones adecuadas para transformar la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en la muestra en un complejo que comprende prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y el resto de unión a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ); y (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en la muestra. En una realización, el procedimiento comprende además: (c) comparar el nivel de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en la muestra con un nivel de control, en el que una diferencia en el nivel de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativa de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII.

En una realización específica, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) contenida en ella

en condiciones adecuadas para transformar la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en un complejo que comprende prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en la muestra.

En ciertas realizaciones, un nivel de control es el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o un nivel promedio de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos sanos. En otras realizaciones, un nivel de control es el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sin SII o un nivel promedio de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos no SII. En otra realización, un nivel de control es el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto enfermo o un nivel promedio de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en muestras de sangre o de suero de una cohorte de sujetos enfermos. Ejemplos no limitantes de sujetos enfermos que son útiles para determinar un nivel de control incluyen sujetos con SII, sujetos con una enfermedad gastrointestinal no SII, sujetos con enfermedad inflamatoria del intestino (EII), sujetos con colitis ulcerosa (CU), sujetos con enfermedad de Crohn (EC), sujetos con celiaquía, sujetos con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), sujetos con cáncer, sujetos con un cáncer del tubo gastrointestinal, sujetos con un cáncer del estómago, sujetos con un cáncer del intestino delgado o grueso, y similares.

En casos en los que el nivel de control es un nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano o sujetos sanos, un elevado nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos sanos, un nivel similar o reducido de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

En casos en los que el nivel de control es un nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en una muestra de sangre o de suero de un sujeto o sujetos con SII, un nivel similar o elevado de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII. En cambio, si el control es un sujeto o sujetos con SII, un nivel reducido de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) presente en una muestra de un sujeto, con respecto al nivel de control, es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto no tenga SII.

En ciertos aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador en sangre o suero adicional seleccionado de histamina y β-triptasa. En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e histamina de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otra realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y β-triptasa de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En una tercera realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), histamina y β-triptasa de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. Preferentemente, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), histamina y/o β-triptasa se detectan de la misma muestra de sangre o de suero, aunque en ciertos casos los biomarcadores pueden detectarse en diferentes muestras de sangre o de suero tomadas del mismo individuo, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en ensayos separados realizados con diferentes alícuotas de una muestra de sangre o de suero de un sujeto. En otras realizaciones, los biomarcadores pueden detectarse en un ensayo de detección de un único múltiplex, por ejemplo, en un ensayo Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>.

En todavía otros aspectos de la invención se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto que comprende la detección de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en una muestra de sangre o de suero y al menos un biomarcador adicional seleccionado de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO-α), interleucina-1 beta (IL-1β), inhibidor tisular de la metaloproteinasas-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, al menos 2 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse. En otras realizaciones, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de los biomarcadores adicionales pueden detectarse.

La muestra usada para detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico es normalmente sangre completa, plasma, suero, saliva, orina, excrementos (es decir, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido corporal, o una muestra de tejido (es decir, biopsia) tal como una muestra del intestino delgado o del colon. Preferentemente, la muestra es suero, sangre completa, plasma, heces, orina, o una biopsia de tejido. En ciertos casos, los procedimientos de la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de

detectar o determinar la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra. En una realización preferida, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de sangre o de suero. En otras realizaciones, el biomarcador adicional puede detectarse de una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto.

5 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de una muestra biológica. En una realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

10 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) de una muestra biológica. En una realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

15 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero e inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

20 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

25 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) de una muestra biológica. En una realización preferida, la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

30 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero e inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

35 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

40 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

45 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) de una muestra biológica. En una realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

50

55

60

65

5 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra biológica. En una realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de sangre o de suero del sujeto. En otra realización preferida, la IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) se detecta en una muestra de heces o una biopsia del intestino del sujeto. En otras realizaciones también se detecta al menos un biomarcador adicional.

10 En una realización, el procedimiento comprende detectar o determinar el nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) de una muestra de sangre o de suero y todos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA) e IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG) de una muestra de sangre o de suero, una muestra de heces, o una biopsia del intestino del sujeto.

15 En ciertas realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un ensayo tal como un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. Ejemplos de ensayos de hibridación adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, transferencia Northern, transferencia puntual, protección de RNasa, y una combinación de los mismos. Un ejemplo no limitante de un ensayo basado en amplificación adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

20 En ciertas otras realizaciones, la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico se determina usando un inmunoensayo o un ensayo inmunohistoquímico. Un ejemplo no limitante de un inmunoensayo adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención incluye un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Ejemplos de ensayos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunofluorescencia tales como ensayos de anticuerpos fluorescentes directos, ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), ensayos de anti-inmunofluorescencia del complemento y ensayos de inmunofluorescencia de avidina-biotina. Otros tipos de ensayos inmunohistoquímicos incluyen ensayos de inmunoperoxidasa.

25 En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente la etapa de determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto. En una realización preferida, el procedimiento comprende: (d) determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el sujeto; y (e) diagnosticar el sujeto como que tiene SII o que no tiene SII usando un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII y el perfil del sistema. En una realización preferida, el procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico, por ejemplo, para prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) o una combinación de la misma como se describe en el presente documento, opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

35 El perfil de síntomas se determina normalmente identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia, y combinaciones de los mismos.

40 En realizaciones preferidas se identifica que la presencia o gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los síntomas descritos en el presente documento, genera un perfil de síntomas que es útil para predecir SII. En ciertos casos se usa un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, oral o telefónica para producir el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta normalmente comprende un conjunto normalizado de preguntas y respuestas con el fin de obtener información de los encuestados en relación con sus síntomas relacionados con SII actuales y/o recientes.

45 En algunas realizaciones, el perfil de síntomas se produce recopilando y/o analizando todas o un subconjunto de las respuestas a las preguntas planteadas en el cuestionario o encuesta. En otras realizaciones, el perfil de síntomas se produce basándose en la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está actualmente sintiendo algún síntoma?" El perfil de síntomas generado según cualquiera de estas realizaciones puede usarse en combinación con un perfil de marcadores de diagnóstico en los procedimientos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de predecir SII.

50 En algunas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que un sujeto tenga SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que

el sujeto tenga SII. En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos que incluyen adicionalmente proporcionar una probabilidad de que una muestra clasificada como una muestra de SII o una muestra sin SII sea de un sujeto con SII. En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender proporcionar una probabilidad altamente improbable, improbable, probable o altamente probable de que la muestra sea de un sujeto que tiene SII.

En otras realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen adicionalmente clasificar un diagnóstico de SII como SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI). En realizaciones relacionadas se proporcionan procedimientos en el presente documento para clasificar adicionalmente una muestra como una muestra de SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI).

## 2. Perfiles de síntomas

En algunas realizaciones, el procedimiento de ayuda en el diagnóstico de SII comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas. Un experto en la materia apreciará que el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas pueden determinarse simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

El perfil de síntomas se determina normalmente identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma seleccionado del grupo que consiste en dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal, pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia, y combinaciones de los mismos.

En realizaciones preferidas se identifica que la presencia o gravedad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, o más de los síntomas descritos en el presente documento, genera un perfil de síntomas que es útil para predecir SII. En ciertos casos se usa un cuestionario u otra forma de encuesta escrita, oral o telefónica para producir el perfil de síntomas. El cuestionario o encuesta normalmente comprende un conjunto normalizado de preguntas y respuestas con el fin de obtener información de los encuestados en relación con sus síntomas relacionados con SII actuales y/o recientes. Por ejemplo, el Ejemplo 13 proporciona a modo de ejemplo preguntas que pueden incluirse en un cuestionario para identificar la presencia o gravedad de uno o más síntomas relacionados con SII en el individuo.

En ciertas realizaciones, el perfil de síntomas se produce recopilando y/o analizando todas o un subconjunto de las respuestas a las preguntas planteadas en el cuestionario o encuesta. En ciertas otras realizaciones, el perfil de síntomas se produce basándose en la respuesta del individuo a la siguiente pregunta: "¿Está actualmente sintiendo algún síntoma?" El perfil de síntomas generado según cualquiera de estas realizaciones puede usarse en combinación con un perfil de marcadores de diagnóstico en los procedimientos basados en algoritmos descritos en el presente documento para mejorar la exactitud de predecir SII.

## 3. Uso de algoritmos estadísticos

En algunas realizaciones, los procedimientos de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto se basan en el perfil de marcadores de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, conjuntamente con un algoritmo estadístico. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos. El sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos puede seleccionarse del grupo que consiste en un clasificador de bosques aleatorios (RF), árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles reforzados, redes neuronales (NN), máquinas de vectores de soporte (SVM), modelos de detector automático de interacciones de chi al cuadrado generales, árboles interactivos, curvas paramétricas de regresión multiadaptativas, de aprendizaje de máquinas, y combinaciones de los mismos. Preferentemente, el sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos es un algoritmo estadístico basado en árboles (por ejemplo, RF, C&RT, etc.) y/o a NN (por ejemplo, NN artificial, etc.). Ejemplos adicionales de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos adecuados para su uso en la presente invención se describen en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/368.285. En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden clasificar una muestra del sujeto como una muestra de SII o muestra sin SII.

En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único. Preferentemente, el sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único comprende un algoritmo estadístico basado en árboles tales como un RF o C&RT. Como ejemplo no limitante, un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único puede usarse para clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en un valor de predicción o probabilidad y la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico (es decir, perfil de marcadores de diagnóstico), solo o en combinación con la presencia o gravedad de al menos un síntoma (es decir, perfil de síntomas). El uso de un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único normalmente clasifica la muestra como una muestra de SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o exactitud global de al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %.

79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. Como tal, la clasificación de una muestra como una muestra de SII o muestra sin SII es útil para ayudar en el diagnóstico de SII en un sujeto.

5 En ciertos otros casos, el algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. Preferentemente, la combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende un RF y una NN, por ejemplo, usados en tándem o en paralelo. Como ejemplo no limitante, un RF puede usarse primero para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcadores de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y luego puede usarse una NN para clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el valor de predicción o probabilidad y el mismo perfil de marcadores de diagnóstico o diferente o combinaciones de perfiles. Ventajosamente, el sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos híbrido RF/NN de la presente invención clasifica la muestra como una muestra de SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o exactitud global de al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En una realización particularmente preferida, el algoritmo estadístico es un clasificador de bosques aleatorios o una combinación de un clasificador de bosques aleatorios y un clasificador de redes neuronales.

20 En algunos casos, los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos pueden procesarse usando un algoritmo de procesamiento. Un algoritmo de procesamiento tal puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en un algoritmo de perceptrón multicapa, de redes de propagación hacia atrás y de Levenberg-Marquardt. En otros casos puede usarse una combinación de tales algoritmos de procesamiento, tal como en un modo en paralelo o en serie.

25 En ciertas otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden además enviar los resultados de la clasificación de SII a un profesional clínico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general. En otra realización, los procedimientos de la presente invención proporcionan un diagnóstico en forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII. Por ejemplo, el individuo puede tener aproximadamente una probabilidad del 0 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 30 90 %, 95 % o superior, de tener SII. En otra realización más, los procedimientos de la presente invención proporcionan adicionalmente un pronóstico de SII en el individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser cirugía, desarrollo de una categoría o subtipo clínico de SII, desarrollo de uno o más síntomas, o recuperación de la enfermedad.

### 35 B. Ensayos y kits

En un aspecto, la presente invención proporciona un ensayo para la detección de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) recubrir una superficie en fase sólida con un primer anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa; (b) poner en contacto la superficie en fase sólida con una muestra de 40 sangre o de suero en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa; (c) poner en contacto la  $\beta$ -triptasa y el complejo de anti- $\beta$ -triptasa con un segundo anticuerpo de detección en condiciones adecuadas para formar un complejo ternario; y (d) poner en contacto el complejo ternario con un sustrato luminiscente o quimioluminiscente.

45 En una realización, el anticuerpo de detección está conjugado con fosfatasa alcalina. En otras realizaciones, el anticuerpo de detección no está conjugado con una enzima y el procedimiento comprende además las etapas de (i) poner en contacto el complejo ternario con un tercer anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina en condiciones adecuadas para formar un complejo cuaternario y (ii) poner en contacto el complejo cuaternario con un sustrato luminiscente o quimioluminiscente.

50 Puede usarse cualquier par de anticuerpos adecuado para los anticuerpos de captura y de detección en un ELISA de sándwich. Un experto en la materia sabrá y apreciará cómo seleccionar un par de anticuerpos apropiado para el ensayo. Generalmente, se seleccionan dos anticuerpos que se unen a la diana de interés, por ejemplo,  $\beta$ -triptasa, en diferentes epítopes de forma que la unión del primer anticuerpo (de captura) no interfiera con el segundo anticuerpo 55 (de detección). En ciertas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjugará con una enzima, por ejemplo, fosfatasa alcalina, para ayudar en la detección del complejo. En otras realizaciones, un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina), que se une al anticuerpo de detección, puede usarse en el ensayo.

60 Generalmente, el complejo se detectará por el uso de un sustrato luminiscente, por ejemplo, un sustrato luminiscente encontrado en un kit tal como Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); o CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1.3.7]decan}-4-il)fenilfosfato de disodio; Tropix, Inc).

65

- 5 En una realización preferida, un ensayo para detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa comprende un ELISA de sándwich que se basa en el uso de un anticuerpo anti-triptasa conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo de detección y un sustrato luminiscente que contiene CPSD para potenciar la sensibilidad del ensayo. El sustrato de CPSD puede encontrarse en sistemas de detección quimioluminiscente, tales como el sistema ELISA-Light™ (Applied Biosystems). En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de detección usado en el ELISA de sándwich es el anticuerpo anti-triptasa G3 (sc-33676; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA).
- 10 En una realización preferida del ensayo, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 500 pg/ml. En ciertas realizaciones, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 500 pg/ml, o inferior a aproximadamente 400 pg/ml, 300 pg/ml, 250 pg/ml, 200 pg/ml, 150 pg/ml, 100 pg/ml, 75 pg/ml, 50 pg/ml, 40 pg/ml, 30 pg/ml, 25 pg/ml, 20 pg/ml, 15 pg/ml, o inferior a aproximadamente 10 pg/ml. En una realización preferida, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 200 pg/ml. En una realización más preferida, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 100 pg/ml. En una realización más preferida, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 50 pg/ml. En una realización más preferida, el límite de detección de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero es inferior a aproximadamente 25 pg/ml.
- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra.
- 20 En una realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, la muestra es suero humano.
- 25 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, la muestra se obtiene de un sujeto que se sospecha que tiene SII.
- 30 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, un mayor nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra con respecto a controles sanos es indicativo de una elevada probabilidad de que el sujeto tenga SII.
- 35 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, el ensayo es un ensayo de inmunoanálisis de adsorción (ELISA).
- 40 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra comprende el uso de un dispositivo de detección.
- 45 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, el dispositivo de detección comprende un lector de placas de luminiscencia.
- 50 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, el dispositivo de detección comprende un espectrofotómetro.
- 55 En otra realización de un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, el ensayo comprende además detectar la presencia o nivel de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y/o histamina en la muestra.
- 60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y un anticuerpo anti-triptasa de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra.
- 65 En una realización de un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, el ensayo ayuda en la diferenciación de SII-D y SII-A de SII-E.
- En otra realización de un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, la muestra es suero humano.
- En otra realización de un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, el ensayo es un ensayo de inmunoanálisis de adsorción (ELISA).

En otra realización de un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en la muestra comprende el uso de un dispositivo de detección.

5 En otra realización de un ensayo para ayudar en la diferenciación de subtipos clínicos de SII, el ensayo comprende además detectar la presencia o nivel de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y/o histamina en la muestra.

10 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un ensayo para ayudar en el diagnóstico de SII, comprendiendo el ensayo: (a) poner en contacto una muestra que tiene  $\beta$ -triptasa, prostaglandina  $E_2$  y/o histamina en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa, prostaglandina  $E_2$  y/o histamina en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa, prostaglandina  $E_2$  y/o histamina y un anticuerpo anti- $\beta$ -triptasa, anti-prostaglandina  $E_2$ , y/o anti-histamina de captura; (b) poner en contacto el complejo con un anticuerpo indicador marcado con enzima para transformar el complejo en un complejo marcado; (c) poner en contacto el complejo marcado con un sustrato para la enzima; y (d) detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina  $E_2$  y/o histamina en la muestra.

15 En ciertas realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento pueden comprender además la detección de la presencia o nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ), interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos.

25 En todavía otras realizaciones, los ensayos proporcionados en el presente documento pueden comprender además la detección de la presencia o nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en una citocina (por ejemplo, IL-8, IL-1 $\beta$ , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 $\beta$ ,  $GRO\alpha$ , CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF y/o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA y/o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG y/o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina y/o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo de NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina y/u orosomucoide), proteína de corte de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquinina (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. En todavía otras realizaciones también puede detectarse la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero, gastrina, y una combinación de los mismos.

35 En ciertas realizaciones, los ensayos proporcionados pueden comprender la detección de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más de los biomarcadores descritos en el presente documento.

40 En otro aspecto se proporcionan kits para ayudar en el diagnóstico de SII en un sujeto, o para clasificar una muestra como una muestra de SII o una muestra sin SII. En ciertas realizaciones, los kits proporcionados en el presente documento contienen un resto de unión para detectar la presencia o nivel de un biomarcador de SII seleccionado de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina  $E_2$  y/o histamina.

45 En otras realizaciones, el kit también contendrá al menos un resto de unión para un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento ( $GRO-\alpha$ ), interleucina-1 beta ( $IL-1\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos.

50 En todavía otras realizaciones, un kit contendrá al menos un resto de unión para un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en una citocina (por ejemplo, IL-8, IL-1 $\beta$ , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 $\beta$ ,  $GRO\alpha$ , CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF y/o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA y/o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG y/o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina y/o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo de NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina y/u orosomucoide), proteína de corte de actina (por ejemplo, gelsolina), proteína S100 (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquinina (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero, gastrina, y combinaciones de los mismos.



En ciertas realizaciones, los kits proporcionados pueden contener un resto de unión para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, o más de los biomarcadores descritos en el presente documento.

5 En una realización preferida se proporciona un kit para detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa en una muestra de sangre o de suero. En una realización, el kit contiene un primer anticuerpo de captura, que está opcionalmente unido a una superficie sólida, y un segundo anticuerpo de detección que se une a un epítipo diferente sobre  $\beta$ -triptasa del anticuerpo de captura. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjugará con fosfatasa alcalina. En  
10 otras realizaciones, el anticuerpo de detección no se conjugará con una enzima, es decir, fosfatasa alcalina. En una realización preferida, el anticuerpo de detección es el anticuerpo anti-triptasa G3 (sc-33676; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA). En una realización más preferida, el anticuerpo anti-triptasa G3 es fosfatasa alcalina adicionalmente conjugada. En ciertas realizaciones, en las que el anticuerpo de detección no está conjugado con la enzima, el kit puede comprender además un tercer anticuerpo específico para el anticuerpo de  
15 detección, estando el tercer anticuerpo conjugado con una enzima, por ejemplo, fosfatasa alcalina.

En ciertas realizaciones, el kit también contendrá un sustrato luminiscente o quimioluminiscente, por ejemplo, un sustrato luminiscente como se encuentra en Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); o CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1.3.7]decan}-4-il)fenilfosfato de disodio; Tropix, Inc). En una realización preferida, el sustrato  
20 luminiscente es CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1.3.7]decan}-4-il)fenilfosfato de disodio).

25 En ciertas realizaciones, el kit para detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a aproximadamente 500 pg/ml. En ciertas realizaciones, el kit es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a aproximadamente 500 pg/ml, o inferior a aproximadamente 400 pg/ml, 300 pg/ml, 250 pg/ml, 200 pg/ml, 150 pg/ml, 100 pg/ml, 75 pg/ml, 50 pg/ml, 40 pg/ml, 30 pg/ml, 25 pg/ml, 20 pg/ml, 15 pg/ml, o  
30 inferior a aproximadamente 10 pg/ml. En una realización preferida, el kit es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a aproximadamente 200 pg/ml. En una realización más preferida, el kit es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a aproximadamente 100 pg/ml. En una realización más preferida, el kit es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a  
35 aproximadamente 50 pg/ml. En una realización más preferida, el kit es adecuado para detectar  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero a una concentración inferior a aproximadamente 25 pg/ml.

### C. Procedimientos de monitorización y asignación de terapia

40 En algunas realizaciones, el diagnóstico de un individuo como que tiene SII se sigue administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para tratar uno o más síntomas asociados a SII. Fármacos para SII adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores de los canales de cloruro, bloqueantes de los canales de cloruro, agonistas de la guanilato ciclase, antibióticos, agonistas de opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, análogos de GLP-1, antagonistas de CRF, probióticos, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente  
45 aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Otros fármacos para SII incluyen agentes de carga, antagonistas de dopaminas, carminativos, tranquilizantes, dexetofisopam, fenitoína, timolol y diltiazem. Adicionalmente, aminoácidos como glutamina y ácido glutámico que regulan la permeabilidad intestinal afectando la señalización neuronal o de células de la glía pueden administrarse para tratar pacientes con SII.  
50

En otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden además clasificar una muestra de SII o un diagnóstico de SII como una muestra de SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI) o diagnóstico. En ciertos casos, la clasificación de la muestra de SII o  
55 diagnóstico en una categoría, forma o subtipo clínico de SII se basa en la presencia o nivel de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más marcadores de clasificación proporcionados en el presente documento. Preferentemente, al menos una forma de SII se distingue de al menos otra forma de SII basada en la presencia o nivel de leptina,  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina. En ciertos casos, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para diferenciar una muestra de SII-E de una muestra de SII-A y/o SII-D en un  
60 individuo previamente identificado como que tiene SII. En ciertos otros casos, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para clasificar una muestra de un individuo no previamente diagnosticado con SII como una muestra de SII-A, muestra de SII-E, muestra de SII-D, o muestra sin SII.

65 En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden además enviar los resultados de la clasificación a un profesional clínico. En ciertas otras realizaciones, los procedimientos proporcionan adicionalmente un diagnóstico en

forma de una probabilidad de que el individuo tenga SII-A, SII-E, SII-D, SII-M o SII-PI. Los procedimientos de la presente invención pueden comprender además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para tratar SII-A, SII-E, SII-D, SII-M o SII-PI. Fármacos adecuados incluyen, pero no se limitan a, tegaserod (Zelnorm™), alosetron (Lotronex®), lubiprostona (Amitiza™), rifamixina (Xifaxan™), MD-1100, probióticos, y una combinación de los mismos.

En casos en los que la muestra se clasifica como una muestra de SII-A o de SII-E y/o al individuo se diagnostica SII-A o SII-E, una dosis terapéuticamente eficaz de tegaserod u otro agonista de 5-HT<sub>4</sub> (por ejemplo, mosaprida, renzaprida, AG1-001, etc.) puede administrarse al individuo. En algunos casos, cuando la muestra se clasifica como SII-E y/o al individuo se diagnostica SII-E, al individuo puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de lubiprostona u otro activador de los canales de cloruro, rifamixina u otro antibiótico que pueda controlar el excesivo crecimiento bacteriano intestinal, MD-1100 u otro agonista de guanilato ciclasa, asimadolina u otro agonista de opioides, o talnetant u otro antagonista de neuroquinina. En otros casos, cuando la muestra se clasifica como SII-D y/o al individuo se diagnostica SII-D, al individuo puede administrársele una cantidad terapéuticamente eficaz de alosetron u otro antagonista de 5-HT<sub>3</sub> (por ejemplo, ramosetron, DDP-225, etc.), crofelemer u otro bloqueante de los canales de cloruro, talnetant u otro antagonista de neuroquinina (por ejemplo, saredutant, etc.), o un antidepresivo tal como un antidepresivo tricíclico.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión de SII en un individuo, comprendiendo el procedimiento: (a) determinar un perfil de marcadores de diagnóstico detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y (b) determinar la presencia o gravedad de SII en el individuo usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico.

En una realización, el procedimiento de monitorización de la progresión o regresión de SII comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinar la presencia o gravedad de SII en el individuo usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento de monitorización de la eficacia del fármaco en un individuo que recibe un fármaco útil para tratar SII, comprendiendo el procedimiento: (a) determinar un perfil de marcadores de diagnóstico detectando la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y (b) determinar la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico.

En una realización, el procedimiento de monitorización de la eficacia del fármaco para SII comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinar la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

Se desvela un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) poner en contacto una primera muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un primer momento con una  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o resto de unión a histamina en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina y  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o resto de unión a histamina; (b) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la primera muestra; (c) poner en contacto una segunda muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un segundo momento con una  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o resto de unión a histamina en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina y  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o resto de unión a histamina; (d) determinar el nivel del complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la segunda muestra; y (e) comparar el nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la primera muestra con el nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina presente en la segunda muestra, en el que un mayor nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la progresión de SII en el sujeto y un menor nivel de  $\beta$ -triptasa, prostaglandina E<sub>2</sub> y/o histamina en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la regresión de SII en el sujeto.

En ciertas realizaciones de los procedimientos de monitorización y asignación de terapia, el procedimiento comprende además detectar la presencia de nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA),

IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia o nivel de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o los diez biomarcadores adicionales proporcionados anteriormente.

5 En todavía otras realizaciones, el procedimiento puede comprender además detectar la presencia de nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en una citocina (por ejemplo, IL-8, IL-1 $\beta$ , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 $\beta$ , GRO $\alpha$ , CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2), factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, VEGF, PEDF, BDNF y/o SDGF), anticuerpo anti-neutrófilos (por ejemplo, ANCA, pANCA, cANCA, NSNA y/o SAPPa), ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA, ASCA-IgG y/o ASCA-IgM), anticuerpo antimicrobiano (por ejemplo, anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina y/o anticuerpo anti-I2), lactoferrina, anticuerpo anti-tTG, lipocalina (por ejemplo, NGAL, complejo de NGAL/MMP-9), MMP (por ejemplo, MMP-9), TIMP (por ejemplo, TIMP-1), alfa-globulina (por ejemplo, alfa-2-macroglobulina, haptoglobina y/u orosomucoide), proteína de corte de actina (por ejemplo, gelsolina), S 100 proteína (por ejemplo, calgranulina), fibrinopéptido (por ejemplo, FIBA), CGRP, taquiquinina (por ejemplo, sustancia P), grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina, y combinaciones de los mismos. En  
10 todavía otras realizaciones también puede detectarse la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero, gastrina, y una combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones puede construirse un panel para medir uno o más de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente y usarse para determinar la presencia o gravedad de SII o para determinar la eficacia de un fármaco para SII. Un experto en la materia apreciará que la presencia o nivel de una pluralidad de marcadores de diagnóstico puede determinarse simultáneamente o secuencialmente usando, por ejemplo, una alícuota o dilución de la muestra del individuo. Como se ha descrito anteriormente, el nivel de un marcador de diagnóstico particular en  
25 la muestra del individuo se considera generalmente que es elevado cuando es al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o el 1000 % superior al nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o población de muestras (por ejemplo, superior a un nivel medio). Similarmente, el nivel de un marcador de diagnóstico particular en la muestra del individuo se considera normalmente que es reducido cuando es al menos  
30 aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % inferior al nivel del mismo marcador en una muestra comparativa o población de muestras (por ejemplo, inferior a un nivel medio).

35 En ciertas realizaciones, el procedimiento de monitorización de la progresión o regresión de SII comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinando la presencia o gravedad de SII en el individuo usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas. En ciertas otras realizaciones, el procedimiento de monitorización de la eficacia del fármaco para SII comprende determinar un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en  
40 combinación con un perfil de síntomas, en el que el perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; y determinando la eficacia del fármaco usando un algoritmo basado en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas. Un experto en la materia apreciará que el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas pueden determinarse simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

45 En algunas realizaciones, determinar la presencia o gravedad de SII o la eficacia de un fármaco para SII se basa en el perfil de marcadores de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, conjuntamente con un algoritmo estadístico. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos. El sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende cualquiera de los sistemas de  
50 aprendizaje de clasificadores estadísticos descritos en el presente documento.

55 En ciertas realizaciones, los procedimientos de la presente invención pueden comprender además comparar la presencia o gravedad de SII en el individuo determinada en la etapa (b) con la presencia o gravedad de SII en el individuo en un momento previo. Como ejemplo no limitante, la presencia o gravedad de SII determinada para un individuo que recibe un fármaco para SII puede compararse con la presencia o gravedad de SII determinada para el mismo individuo antes del inicio del uso del fármaco para SII o en un momento anterior en la terapia. En ciertas otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención pueden comprender determinar la eficacia del fármaco para SII comparando la eficacia del fármaco para SII determinada en la etapa (b) con la eficacia del fármaco para SII en el individuo en un momento anterior en la terapia. En realizaciones adicionales, los procedimientos pueden  
60 comprender además enviar los resultados de monitorización de SII a un profesional clínico, por ejemplo, un gastroenterólogo o un médico general.

D. Medio legible por ordenador y sistemas para clasificar muestras

65 En un aspecto, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de suero o de sangre de un sujeto está asociada o

no a síndrome del intestino irritable (SII), comprendiendo el código instrucciones para aplicar un procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico, en el que el perfil de marcadores de diagnóstico indica el nivel de al menos un marcador de diagnóstico seleccionado del grupo que consiste en  $\beta$ -triptasa, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y una combinación de los mismos.

En otras realizaciones, el medio legible por ordenador para confirmar SII comprende instrucciones para aplicar un procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas. Un experto en la materia apreciará que el procedimiento estadístico puede aplicarse al perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

En una realización específica, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que incluye código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo está asociada o no a SII, comprendiendo el código instrucciones para aplicar un procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico, en el que el perfil de marcadores de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que incluye código para controlar uno o más procesadores para clasificar si una muestra de un individuo está asociada o no a SII, comprendiendo el código: (a) instrucciones para aplicar un primer procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico, en el que el perfil de marcadores de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, (b) instrucciones para aplicar un segundo procedimiento estadístico al mismo conjunto de datos o conjuntos de datos diferentes para producir una segunda decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII.

En una realización, el medio legible por ordenador para confirmar SII comprende instrucciones para aplicar un procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas.

En otras realizaciones, el medio legible por ordenador para descartar primero EII y luego confirmar SII comprende instrucciones para aplicar un primer procedimiento estadístico a un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas; y si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, instrucciones para aplicar un segundo procedimiento estadístico al mismo conjunto de datos o conjuntos de datos diferentes para producir una segunda decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII. Un experto en la materia apreciará que el primer y/o segundo procedimiento estadístico puede aplicarse al perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

En una realización, el primer y segundo procedimientos estadísticos se implementan en diferentes procesadores. Alternativamente, el primer y segundo procedimientos estadísticos se implementan en un único procesador. En otra realización, el primer procedimiento estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos. Ejemplos de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos adecuados para su uso en la presente invención se describen anteriormente. En ciertos casos, el primer y/o segundo procedimiento estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único tal como, por ejemplo, un RF o C&RT. En ciertos otros casos, el primer y/o segundo procedimiento estadístico es una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. Como ejemplo no limitante, la combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende un RF y una NN o SVM, por ejemplo, usados en tándem. En algunos casos, los datos obtenidos usando el sistema o sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos pueden procesarse usando un algoritmo de procesamiento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema para clasificar si una muestra de suero o de sangre de un sujeto está asociada o no a síndrome del intestino irritable (SII), comprendiendo el sistema: (a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico, en el que el perfil de marcadores de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de

diagnóstico seleccionado del grupo que consiste en  $\beta$ -triptasa, histamina, prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), y una combinación de los mismos; (b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos aplicando un procedimiento estadístico al conjunto de datos para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico; y (c) un módulo de visualización configurado para visualizar la decisión estadísticamente derivada.

En ciertas realizaciones, el sistema para clasificar si una muestra de suero o de sangre está asociada o no a SII, ayudar en el diagnóstico de SII, o confirmar SII, comprende un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos aplicando un procedimiento estadístico al conjunto de datos para producir una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y el perfil de síntomas; y un módulo de visualización configurado para visualizar la decisión estadísticamente derivada.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un sistema para clasificar si una muestra de un individuo está asociada o no a SII, comprendiendo el sistema: (a) un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico, en el que el perfil de marcadores de diagnóstico indica la presencia o nivel de al menos un marcador de diagnóstico en la muestra; (b) un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos aplicando un primer procedimiento estadístico al conjunto de datos para producir una primera decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de EII o muestra sin EII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico; si la muestra se clasifica como una muestra sin EII, un módulo de procesamiento de datos configurado para aplicar un segundo procedimiento estadístico al mismo conjunto de datos o conjuntos de datos diferentes para producir una segunda decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII; y (c) un módulo de visualización configurado para visualizar la primera y/o la segunda decisión estadísticamente derivada.

En una realización, el sistema para descartar primero EII y luego confirmar SII comprende un módulo de adquisición de datos configurado para producir un conjunto de datos que comprende un perfil de marcadores de diagnóstico opcionalmente en combinación con un perfil de síntomas que indica la presencia o gravedad de al menos un síntoma en el individuo; un módulo de procesamiento de datos configurado para procesar el conjunto de datos aplicando un primer procedimiento estadístico al conjunto de datos para producir una primera decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra como una muestra de EII o no

#### IV. Enfermedades y trastornos con síntomas similares al SII

Una variedad de enfermedades y trastornos estructurales o metabólicos puede producir signos o síntomas que son similares al SII. Como ejemplos no limitantes, pacientes con enfermedades y trastornos tales como enfermedad inflamatoria del intestino (EII), celiaquía (EC), inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis con bolsa ileoanal, colitis microscópica, diarrea infecciosa crónica, deficiencia de lactasa, cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal), una obstrucción mecánica del intestino delgado o colon, una infección entérica, isquemia, mala digestión, malabsorción, endometriosis y trastornos inflamatorios no identificados del tubo intestinal pueden presentar molestia abdominal asociada a dolor de leve a moderado y un cambio en la consistencia y/o frecuencia de las deposiciones que son similares al SII. Síntomas similares al SII adicionales puede incluir diarrea crónica o estreñimiento o una forma alterna de cada uno, pérdida de peso, distensión abdominal o hinchazón, y moco en las heces.

La mayoría de los pacientes con EII pueden clasificarse en uno de los dos subtipos clínicos distintos, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria que afecta a la parte inferior del ileon y que frecuentemente implica al colon y otras regiones del tubo intestinal. La colitis ulcerosa se caracteriza por una inflamación localizada principalmente en la mucosa y submucosa del intestino grueso. Los pacientes que padecen estos subtipos clínicos de EII normalmente tienen síntomas similares al SII tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea crónica, pérdida de peso y dolor tipo cólico.

La presentación clínica de la celiaquía también se caracteriza por síntomas similares al SII tales como molestia abdominal asociada a diarrea crónica, pérdida de peso y distensión abdominal. La celiaquía es un trastorno inmunomediado de la mucosa intestinal que está normalmente asociada a atrofia vellosa, hiperplasia de las criptas y/o inflamación del revestimiento de la mucosa del intestino delgado. Además de la malabsorción de nutrientes, los individuos con celiaquía están en riesgo de deficiencia de minerales, avitaminosis, osteoporosis, enfermedades autoinmunitarias y tumores malignos intestinales (por ejemplo, linfoma y carcinoma). Se cree que la exposición a proteínas tales como gluten (por ejemplo, las proteínas glutenina y prolamina que están presentes en trigo, centeno, cebada, avena, mijo, tritical, espelta y kamut), en el contexto genético y medioambiental apropiados, es responsable de causar la celiaquía.

Otras enfermedades y trastornos caracterizados por inflamación intestinal que presentan síntomas similares al SII incluyen, por ejemplo, inflamación aguda, diverticulitis, anastomosis con bolsa ileoanal, colitis microscópica y diarrea

5 infecciosa crónica, además de trastornos inflamatorios no identificados del tubo intestinal. Los pacientes que experimentan episodios de inflamación aguda normalmente tienen elevados niveles de proteína C reactiva (CRP), además de síntomas similares al SII. La CRP se produce por el hígado durante la fase aguda del proceso inflamatorio y normalmente se libera aproximadamente 24 horas después del comienzo del proceso inflamatorio. Los  
 10 pacientes que padecen diverticulitis, anastomosis con bolsa ileoanal, colitis microscópica y diarrea infecciosa crónica normalmente tienen elevados niveles de lactoferrina y/o calprotectina fecal, además de síntomas similares al SII. La lactoferrina es una glicoproteína secretada por las membranas mucosas y es la principal proteína en los gránulos secundarios de leucocitos. Los leucocitos se reclutan comúnmente a sitios inflamatorios en los que se activan, liberando el contenido de los gránulos al área de alrededor. Este proceso aumenta la concentración de lactoferrina en las heces.

15 Se observan elevados niveles de lactoferrina en pacientes con anastomosis con bolsa ileoanal (es decir, se crea una bolsa tras la resección completa del colon en casos graves de enfermedad de Crohn) cuando se compara con otras afecciones no inflamatorias de la bolsa, como síndrome de la bolsa irritable. También se observan elevados niveles de lactoferrina en pacientes con diverticulitis, una afección en la que las bolsas abombadas (es decir, divertículos) en el tubo digestivo se inflaman y/o se infectan, causando dolor abdominal grave, fiebre, náuseas y un marcado cambio en los hábitos intestinales. La colitis microscópica es un trastorno inflamatorio crónico que también está asociado con elevados niveles de lactoferrina fecal. La colitis microscópica se caracteriza por diarrea líquida persistente (no hemorrágica), dolor abdominal normalmente asociado a pérdida de peso, una mucosa normal durante el examen de colonoscopia y radiológico, y cambios histopatológicos muy específicos. La colitis microscópica consiste en dos  
 20 enfermedades, colitis colagenosa y colitis linfocítica. La colitis colagenosa es de etiología desconocida y se encuentra en pacientes con diarrea líquida a largo plazo y un examen de colonoscopia normal. Tanto la colitis colagenosa como la colitis linfocítica se caracterizan por linfocitos elevados en el revestimiento del colon. La colitis colagenosa se caracteriza adicionalmente por un engrosamiento de la capa de colágeno subepitelial del colon. La diarrea infecciosa crónica es una enfermedad que también está asociada a elevados niveles de lactoferrina fecal. La diarrea infecciosa crónica se produce normalmente por una infección bacteriana, viral o protozoica, presentando los  
 25 pacientes síntomas similares al SII tales como diarrea y dolor abdominal. También se observan elevados niveles de lactoferrina en pacientes con EII.

30 Además de determinar los niveles de CRP y/o lactoferrina y/o calprotectina, enfermedades y trastornos asociados a inflamación intestinal también pueden descartarse detectando la presencia de sangre en las heces, tal como hemoglobina fecal. La hemorragia intestinal que se produce sin el conocimiento del paciente se llama hemorragia oculta o escondida. La presencia de hemorragia oculta (por ejemplo, hemoglobina fecal) se observa normalmente en una muestra de heces del paciente. Otras afecciones tales como úlceras (por ejemplo, gástrica, duodenal), cáncer (por ejemplo, cáncer de estómago, cáncer colorrectal) y hemorroides también pueden presentar síntomas similares al SII que incluyen dolor abdominal y un cambio en la consistencia y/o frecuencia de las deposiciones.

35 Además, también pueden evaluarse los niveles de calprotectina fecal. La calprotectina es una proteína de unión a calcio con actividad antimicrobiana derivada predominantemente de neutrófilos y monocitos. Se ha encontrado que la calprotectina tiene relevancia clínica en fibrosis quística, artritis reumatoide, EII, cáncer colorrectal, VIH y otras enfermedades inflamatorias. Su nivel se ha medido en suero, plasma, líquidos bucal, cefalorraquídeo y sinovial, orina y heces. Se han reconocido las ventajas de la calprotectina fecal en trastornos GI: estable durante 3-7 días a temperatura ambiente permitiendo el transporte de muestras mediante correo regular; se correlacionan con alfa 1-antitripsina fecal en pacientes con enfermedad de Crohn; y es elevada en una gran mayoría de pacientes con  
 40 carcinomas gastrointestinales y EII. Se encontró que la calprotectina fecal se correlacionaba bien con clasificaciones endoscópicas e histológicas de actividad de enfermedad en colitis ulcerosa, y con secreción fecal de granulocitos neutrófilos marcados con indio-111, que es un patrón de actividad de enfermedad en EII.

45 En vista de lo anterior, es evidente que una amplia matriz de enfermedades y trastornos puede producir síntomas similares al SII, creando así un obstáculo sustancial para clasificar definitivamente una muestra como una muestra de SII. Sin embargo, la presente invención vence esta limitación clasificando una muestra de un individuo como una muestra de SII usando, por ejemplo, un algoritmo estadístico, o excluyendo (es decir, descartando) aquellas enfermedades y trastornos que comparten una presentación clínica similar a SII e identificando (es decir, confirmando) SII en una muestra usando, por ejemplo, una combinación de algoritmos estadísticos.

55 V. Marcadores de diagnóstico

Una variedad de marcadores de diagnóstico son adecuados para su uso en los procedimientos, sistemas y código de la presente invención para clasificar una muestra de un individuo como una muestra de SII o para descartar una o  
 60 más enfermedades o trastornos asociados a síntomas similares al SII en una muestra de un individuo. Ejemplos de marcadores de diagnóstico incluyen, sin limitación, citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos anti-neutrófilos, anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae, anticuerpos antimicrobianos, anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (tTG), lipocalinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), complejos de lipocalina y MMP, inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), globulinas (por ejemplo, alfa-globulinas), proteínas de corte de actina, proteínas S100, fibrinopéptidos, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), taquiquininas, grelina, neurotensina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), serina proteasas (por ejemplo, triptasas tales como  $\beta$ -triptasa, elastasa, etc.),  
 65

prostaglandina (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>), histamina, proteína C reactiva (CRP), lactoferrina, anticuerpos anti-lactoferrina, calprotectina, hemoglobina, NOD2/CARD15, transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano hidroxilasa-1, 5-hidroxitriptamina (5-HT), lactulosa, y combinaciones de los mismos. Los marcadores de diagnóstico adicionales para predecir SII según la presente invención pueden seleccionarse usando las técnicas descritas en el Ejemplo 14 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, presentada el 14 de agosto de 2007, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines. Un experto en la materia también conocerá otros marcadores de diagnóstico adecuados para su uso en la presente invención.

En realizaciones particulares, un perfil de marcadores de diagnóstico se determina detectando la presencia o nivel de al menos un, dos, o los tres de los siguiente biomarcadores: una serina proteasa (por ejemplo, una triptasa tal como β-triptasa); una prostaglandina (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>); y/o histamina.

En otras realizaciones, la presencia o nivel de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más marcadores de diagnóstico se determina en la muestra del individuo. En ciertos casos, la citocina comprende uno o más de las citocinas descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de IL-8, IL-1β, inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), leptina, osteoprotegerina (OPG), MIP-3β, GROα, CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2 se determina en la muestra del individuo. En ciertos otros casos, el factor de crecimiento comprende uno o más de los factores de crecimiento descritos más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y/o anfiregulina (SDGF) se determina en la muestra del individuo.

En algunos casos, el anticuerpo anti-neutrófilos comprende ANCA, pANCA, cANCA, NSNA, SAPPa, y combinaciones de los mismos. En otros casos, ASCA comprende ASCA-IgA, ASCA-IgG, ASCA-IgM, y combinaciones de los mismos. En casos adicionales, el anticuerpo antimicrobiano comprende un anticuerpo anti-OmpC, anticuerpo anti-flagelina, anticuerpo anti-I2, y combinaciones de los mismos.

En ciertos casos, la lipocalina comprende una o más de las lipocalinas descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y/o un complejo de NGAL y una metaloproteínasa de la matriz (por ejemplo, complejo de NGAL/MMP-9) se determina en la muestra del individuo. En otros casos, la metaloproteínasa de la matriz (MMP) comprende una o más de las MMP descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de MMP-9 se determina en la muestra del individuo. En casos adicionales, el inhibidor tisular de la metaloproteínasa (TIMP) comprende uno o más de los TIMP descritos más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de TIMP-1 se determina en la muestra del individuo. En todavía casos adicionales, la alfa-globulina comprende una o más de las alfa-globulinas descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de alfa-2-macroglobulina, haptoglobina y/u orosomucoide se determina en la muestra del individuo.

En ciertos otros casos, la proteína de corte de actina comprende una o más de las proteínas de corte de actina descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de gelsolina se determina en la muestra del individuo. En casos adicionales, la proteína S 100 comprende una o más de las proteínas S100 descritas más adelante que incluyen, por ejemplo, calgranulina. En todavía otros casos, el fibrinopéptido comprende uno o más de los fibrinopéptidos descritos más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de fibrinopéptido A (FIBA) se determina en la muestra del individuo. En casos adicionales, la presencia o nivel de una taquiquinina tal como sustancia P, neuroquinina A y/o neuroquinina B se determina en la muestra del individuo.

En algunos casos, la serina proteasa comprende una o más de las serina proteasas descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de una serina proteasa tal como triptasa (por ejemplo, β-triptasa) se determina en la muestra del individuo. En otros casos, la prostaglandina comprende una o más de las prostaglandinas descritas más adelante. Preferentemente, la presencia o nivel de una prostaglandina tal como PGE<sub>2</sub> se determina en la muestra del individuo.

También puede determinarse la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico tales como, por ejemplo, anticuerpo anti-lactoferrina, L-selectina/CD62L, elastasa, proteína C reactiva (CRP), calprotectina, autoanticuerpo de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero y/o gastrina.

#### A. Serina proteasas

La determinación de la presencia o nivel de al menos una serina proteasa en una muestra es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "serina proteasa" incluye cualquier miembro de una familia de proteasas en la que uno de los aminoácidos en el sitio activo es serina. Ejemplos no limitantes de serina proteasas incluyen triptasa (por ejemplo, α-triptasa, β-triptasa, γ-triptasa y/o Δ-triptasa), elastasa, quimotripsina, tripsina, subtilisina, y combinaciones de las mismas. La triptasa es una proteasa neutra específica abundante de mastocitos humanos que puede medirse en diversos fluidos biológicos y puede servir de marcador útil para la activación de mastocitos. En realidad, la triptasa puede usarse como marcador para la activación de mastocitos en

SII. Se cree que la triptasa, posiblemente por activación del receptor-2 activado por proteasa, es un buen candidato para explicar los efectos pro-secretores y pro-inflamatorios de mastocitos; sin embargo, también podrían participar otros mediadores de mastocitos. En una realización preferida, la  $\beta$ -triptasa (TPBAB1) se detecta en una muestra de sangre o de suero de un sujeto. La  $\beta$ -triptasa, también comúnmente denominada triptasa beta-1 o triptasa I, está codificada por el gen de triptasa alfa/beta 1 (TPSAB1; NM\_003294), que se traduce para formar una proteína precursora de triptasa beta-1 de 275 aminoácidos (NP\_003285). Entonces, la proteína precursora se procesa por la eliminación de un péptido señal (aminoácidos 1-18) y activación del propéptido de péptido (aminoácidos 19-30) produciendo el polipéptido de triptasa beta-1 maduro (aminoácidos 31-275; UniProt: Q15661).

En ciertos casos, la presencia o nivel de una serina proteasa particular tal como triptasa se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una serina proteasa particular tal como triptasa se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Técnicas de ELISA adecuadas para determinar la presencia o nivel de triptasa en una muestra de suero se describen en el presente documento. En una realización particularmente preferida, el nivel de  $\beta$ -triptasa se detecta en una muestra de sangre o de suero usando un ensayo de ELISA de sándwich en el que el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti- $\beta$ -triptasa conjugado con fosfatasa alcalina, por ejemplo, el anticuerpo comercial G3. Entonces puede usarse un sustrato luminiscente, por ejemplo, CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)-fenilfosfato de disodio) para potenciar la sensibilidad del ensayo.

#### B. Prostaglandinas

También es útil la determinación de la presencia o nivel de al menos una prostaglandina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "prostaglandina" incluye cualquier miembro de un grupo de compuestos lipídicos que se derivan enzimáticamente de ácidos grasos y tienen importantes funciones en el cuerpo animal. Cada prostaglandina contiene 20 átomos de carbono, que incluyen un anillo de 5 carbonos. Las prostaglandinas, junto con los tromboxanos y las prostaciclina, forman la clase prostanoides de los derivados de ácidos grasos. La clase prostanoides es una subclase de los eicosanoides. Ejemplos no limitantes de prostaglandinas incluyen prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) se detecta en una muestra de sangre o de suero de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene SII. En ciertas realizaciones, la PGE<sub>2</sub> puede detectarse por un ensayo de ELISA o quimioluminiscente. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de PGE<sub>2</sub> en una muestra de suero están disponibles de, por ejemplo, Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI).

#### C. Histamina

También es útil la determinación de la presencia o nivel de histamina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "histamina" incluye una amina biogénica que participa en respuestas inmunitarias locales, además de regular la función fisiológica en el intestino y que actúa de neurotransmisor. La histamina desencadena la respuesta inflamatoria. Como parte de una respuesta inmunitaria a patógenos extraños, la histamina se produce por basófilos y por mastocitos encontrados en los tejidos conjuntivos de alrededor. La histamina aumenta la permeabilidad de los capilares a los glóbulos blancos y otras proteínas, con el fin de permitirles que interactúen con invasores extraños en los tejidos afectados. Se encuentra en prácticamente todas las células del cuerpo animal. En una realización preferida, la histamina se detecta en una muestra de sangre o de suero de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene SII. En ciertas realizaciones, la histamina puede detectarse por un ensayo de ELISA o quimioluminiscente. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de histamina en una muestra de suero están disponibles de, por ejemplo, Immunotech (República Checa) y Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI).

#### D. Citocinas

La determinación de la presencia o nivel de al menos una citocina en una muestra es particularmente útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "citocina" incluye cualquiera de una variedad de polipéptidos o proteínas secretados por células inmunitarias que regulan una variedad de funciones del sistema inmunitario y engloba pequeñas citocinas tales como quimiocinas. El término "citocina" también incluye adipocitocinas, que comprenden un grupo de citocinas secretadas por adipocitos que funcionan, por ejemplo, en la regulación del peso corporal, hematopoyesis, angiogénesis, cicatrización, resistencia a la insulina, respuesta inmunitaria y respuesta inflamatoria.

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos una citocina que incluye, pero no se limita a, TNF- $\alpha$ , inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), osteoprotegerina (OPG), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de IL-6 soluble (sIL-6R), IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23 y IL-27 se determina en una muestra. En ciertos otros aspectos, la presencia o nivel de al menos una quimiocina tal como, por ejemplo, CXCL1/GRO1/GRO $\alpha$ , CXCL2/GRO2, CXCL3/GRO3, CXCL4/PF-4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC,



CXCL12/SDF-1, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15, CXCL16, CXCL17/DMC, CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/CCL10, CCL11/eotaxina, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/MIP-5, CCL16/LEC, CCL17/TARC, CCL18/MIP-4, CCL19/MIP-3 $\beta$ , CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF1, CCL24/eotaxina-2, CCL25/TECK, CCL26/eotaxina-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CL1, CL2 y CX<sub>3</sub>CL1 se determina en una muestra. En ciertos otros aspectos, la presencia o nivel de al menos una adipocitocina que incluye, pero no se limita a, leptina, adiponectina, resistina, inhibidor-1 del activador del plasminógeno activo o total (PAI-1), visfatina y proteína 4 de unión a retinol (RBP4) se determina en una muestra. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de IL-8, IL-1 $\beta$ , TWEAK, leptina, OPG, MIP-3 $\beta$ , GRO $\alpha$ , CXCL4/PF-4 y/o CXCL7/NAP-2.

En ciertos casos, la presencia o nivel de una citocina particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una citocina particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una citocina tal como IL-8, IL-1 $\beta$ , MIP-3 $\beta$ , GRO $\alpha$ , CXCL4/PF-4 o CXCL7/NAP-2 en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN), Neogen Corp. (Lexington, KY), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA), Invitrogen (Camarillo, CA), Calbiochem (San Diego, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), QIAGEN Inc. (Valencia, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y/o Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA).

### 1. TWEAK

TWEAK es un miembro de la superfamilia de TNF de citocinas estructuralmente relacionadas. Puede encontrarse TWEAK anclado a membrana de longitud completa sobre la superficie de muchos tipos de células y una forma biológicamente activa más pequeña generada mediante procesamiento proteolítico también se ha detectado en el medio extracelular (véase, por ejemplo, Chicheportiche et ál., *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997)). TWEAK actúa mediante la unión a un miembro de la superfamilia de receptores de TNF llamado factor de crecimiento de fibroblastos inducible 14 (Fn14; también conocido como miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral 12A o TNFRSF12A). TWEAK tiene múltiples actividades biológicas, que incluyen estimulación de crecimiento celular y angiogénesis, inducción de citocinas inflamatorias y estimulación de la apoptosis (véase, por ejemplo, Wiley et ál., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14:241-249 (2003)). En particular, se ha mostrado que TWEAK induce la expresión de PGE<sub>2</sub>, MMP-1, IL-6, IL-8, RANTES y IP-10 en fibroblastos y sinoviocitos, y regula por incremento la expresión de ICAM-1, E-selectina, IL-8 y MCP-1 en células endoteliales (véase, por ejemplo, Campbell et ál., *Front. Biosci.*, 9:2273-2284 (2004)). También se ha demostrado que la unión de TWEAK al receptor de Fn14, o expresión en exceso de Fn14 constitutivo, activa la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B, que desempeña una función importante en procesos inmunes e inflamatorios, oncogénesis, resistencia a terapia contra el cáncer y tumorigénesis (véase, por ejemplo, Winkles et ál., *Cancer Lett.*, 235:11-17 (2006); y Winkles et ál., *Front. Biosci.*, 12:2761-2771 (2007)). Un experto en la materia apreciará que TWEAK también se conoce como el miembro 12 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNFSF12), ligando APO3 (APO3L), CD255, ligando DR3, FN14 y UNQ181/PRO207.

Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de TWEAK en una muestra biológica tal como una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA), Agdia Inc. (Elkhart, IN), American Research Products Inc. (Belmont, MA), Biomedica Corp. (Foster City, CA), BioVision, Inc. (Mountain View, CA) y Kamiya Biomedical Co. (Seattle, WA).

### 2. Osteoprotegerina (OPG)

La OPG es un miembro de 401 aminoácidos de la superfamilia de TNF de citocinas estructuralmente relacionadas. La OPG, que es homóloga al activador de receptores de NF $\kappa$ B (RANK), inhibe la diferenciación de macrófagos en osteoclastos y regula la resorción de osteoclastos actuando como receptor señuelo soluble para el ligando RANK (RANKL; también conocido como ligando OPG (OPGL)). Como resultado, el sistema OPG-RANK-RANKL desempeña una función directa y esencial en la formación, función y supervivencia de osteoclastos. También se ha mostrado que el sistema OPG-RANK-RANKL modula la migración de células cancerosas, controlando así el desarrollo de metástasis al hueso. Un experto en la materia apreciará que OPG también se conoce como osteoprotegrina y factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF).

Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de OPG en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Immunodiagnostic Systems Ltd. (Baldon, Reino Unido) y BioVendor, LLC (Candler, NC).

### 3. Leptina

La leptina, un miembro de la familia de adipocitocinas de citocinas, es una hormona peptídica de 16 kD que

desempeña una función crítica en la regulación del peso corporal inhibiendo el consumo de alimentos y estimulando el gasto de energía. Se sintetiza predominantemente por adipocitos y circula en el plasma en cantidades proporcionales al contenido de grasa del cuerpo (véase, por ejemplo, Maffei et ál., *Nat. Med.*, 1:1155-1161 (1995); Considine et ál., *Diabetes*, 45:992-994 (1996)). La leptina muestra un alto grado de homología entre diferentes especies y también es análoga en estructura a otras citocinas (véase, por ejemplo, Madej et ál., *FEBS Lett.*, 373:13-18 (1995)). La leptina actúa mediante el receptor de leptina, un receptor de un único dominio transmembrana de la superfamilia de los receptores de citocina de clase I, que se caracterizan por motivos extracelulares de cuatro residuos de cisteína y varios dominios de fibronectina tipo III (véase, por ejemplo, Heim, *Eur. J. Clin. Invest.*, 26:1-12 (1996)). Se sabe que el receptor de leptina existe como un homodímero y se activa por cambios conformacionales que se producen tras la unión del ligando al receptor (véase, por ejemplo, Devos et ál., *J. Biol. Chem.*, 272:18304-18310 (1997)). Hasta la fecha se han identificado seis isoformas de receptores de leptina, generadas por corte y empalme alternativo (véase, por ejemplo, Wang et ál., *Nature*, 393:684-688 (1998); Lee et ál., *Nature*, 379:632-635 (1996)).

Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de leptina en una muestra biológica tal como una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN), B-Bridge International (Mountain View, CA), Neogen Corp. (Lexington, KY), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO), Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX), Immuno-Biological Laboratories, Inc. (Mineápolis, MN) y Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI).

#### E. Factores de crecimiento

La determinación de la presencia o nivel de uno o más factores de crecimiento en una muestra también es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "factor de crecimiento" incluye cualquiera de una variedad de péptidos, polipéptidos, o proteínas que pueden estimular la proliferación celular y/o diferenciación celular.

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos un factor de crecimiento que incluye, pero no se limita a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF; también conocido como SERPINF1), anfiregulina (AREG; también conocida como factor de crecimiento derivado de schwannoma (SDGF)), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento- $\alpha$  transformante (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento- $\beta$  transformante (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP1-BMP15), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento nervioso  $\beta$  ( $\beta$ -NGF), factores neurotróficos (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4), etc.), factor-9 de diferenciación del crecimiento (GDF-9), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), miostatina (GDF-8), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO) se determina en una muestra. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de EGF, VEGF, PEDF, anfiregulina (SDGF) y/o BDNF.

En ciertos casos, la presencia o nivel de un factor de crecimiento particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de un factor de crecimiento particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de un factor de crecimiento tal como EGF, VEGF, PEDF, SDGF o BDNF en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY), Promega (Madison, WI), R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN), Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), Neogen Corp. (Lexington, KY), PeproTech (Rocky Hill, NJ), Alpco Diagnostics (Salem, NH), Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL) y/o Abazyme (Needham, MA).

#### F. Lipocalinas

La determinación de la presencia o nivel de una o más lipocalinas en una muestra también es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "lipocalina" incluye cualquiera de una variedad de pequeñas proteínas extracelulares que se caracterizan por varias propiedades de reconocimiento molecular comunes: la capacidad para unirse a una variedad de pequeñas moléculas hidrófobas; unión a receptores de superficie celular específicos; y formación de complejos con macromoléculas solubles (véase, por ejemplo, Flowers, *Biochem. J.*, 318:1-14 (1996)). Las variadas funciones biológicas de lipocalinas están mediadas por una o más de estas propiedades. La familia de proteínas lipocalinas presenta gran diversidad funcional, con funciones en el transporte de retinol, coloración críptica de invertebrados, olfato y transporte de feromonas, y síntesis de prostaglandinas. Las lipocalinas también participan en la regulación de la homeostasis celular y la modulación de la respuesta inmunitaria y, como proteínas transportadoras, actúan en la eliminación general de compuestos endógenos y exógenos. Aunque las lipocalinas tienen gran diversidad al nivel de secuencia, su estructura tridimensional es una característica unificadora. Las estructuras cristalinas de lipocalina están altamente

conservadas y comprenden un único barril beta antiparalelo unido continuamente a hidrógeno de ocho cadenas, que encierra un sitio de unión al ligando interno.

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos una lipocalina que incluye, pero no se limita a, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL; también conocida como lipocalina neutrófila humana (HNL) o lipocalina-2), proteína de glándulas de von Ebner (VEGP; también conocida como lipocalina-1), proteína de unión al retinol (RBP), purpurina (PURP), proteína de unión a ácido retinoico (RABP),  $\alpha_{2u}$ -globulina (A2U), proteína urinaria mayor (MUP), proteína de unión a bilina (BBP),  $\alpha$ -crustacianina, proteína 14 del embarazo (PP14),  $\beta$ -lactoglobulina (Blg),  $\alpha_1$ -microglobulina (A1M), la cadena gamma de C8 (C8 $\gamma$ ), apolipoproteína D (ApoD), lazarillo (LAZ), prostaglandina D2 sintasa (PGDS), proteína específica quiescente (QSP), proteína del plexo coroideo, proteína de unión a odorante (OBP),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AGP), probasina (PBAS), afrodisisina, orosomucoide y proteína endometrial asociada a progestágeno (PAEP) se determina en una muestra. En ciertos otros aspectos se determina la presencia o nivel de al menos un complejo de lipocalina que incluye, por ejemplo, un complejo de NGAL y una metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, complejo de NGAL/MMP-9). Preferentemente, se determina la presencia o nivel de NGAL o un complejo del mismo con MMP-9.

En ciertos casos, la presencia o nivel de una lipocalina particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una lipocalina particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una lipocalina tal como NGAL en una muestra de suero, plasma o de orina están disponibles de, por ejemplo, AntibodyShop A/S (Gentofte, Dinamarca), LabClinics SA (Barcelona, España), Lucerna-Chem AG (Lucerna, Suiza), R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN) y Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI). Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel del complejo de NGAL/MMP-9 están disponibles de, por ejemplo, R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN). Técnicas de ELISA de NGAL y complejos de NGAL/MMP-9 adicionales se describen en, por ejemplo, Kjeldsen et ál., Blood, 83:799-807 (1994); y Kjeldsen et ál., J. Immunol. Methods, 198:155-164 (1996).

#### G. Metaloproteinasas de la matriz

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos una metaloproteinasas de la matriz (MMP) en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "metaloproteinasas de la matriz" o "MMP" incluye endopeptidasas dependientes de cinc que pueden degradar una variedad de proteínas de la matriz extracelular, escindiendo receptores de la superficie celular, liberando ligandos apoptóticos y/o regulando quimiocinas. También se cree que las MMP desempeñan una función importante en los comportamientos de las células tales como proliferación celular, migración (adhesión/dispersión), diferenciación, angiogénesis y defensa del huésped.

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos una MMP que incluye, pero no se limita a, MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-2 (gelatinasa-A), MMP-3 (estromelisin-1), MMP-7 (matrilisina), MMP-8 (colagenasa de neutrófilos), MMP-9 (gelatinasa-B), MMP-10 (estromelisin-2), MMP-11 (estromelisin-3), MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-13 (colagenasa-3), MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18 (colagenasa-4), MMP-19, MMP-20 (enamelisina), MMP-21, MMP-23, MMP-24, MMP-25, MMP-26 (matrilisina-2), MMP-27 y MMP-28 (epilisina) se determina en una muestra. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de MMP-9.

En ciertos casos, la presencia o nivel de una MMP particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una MMP particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una MMP tal como MMP-9 en una muestra de suero o de plasma están disponibles de, por ejemplo, Calbiochem (San Diego, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA) y R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN).

#### H. Inhibidor tisular de metaloproteinasas

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos un inhibidor tisular de la metaloproteinasas (TIMP) en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor tisular de la metaloproteinasas" o "TIMP" incluye proteínas que pueden inhibir MMP.

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos un TIMP que incluye, pero no se limita a, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 se determina en una muestra. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de TIMP-1.

En ciertos casos, la presencia o nivel de un TIMP particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros

casos, la presencia o nivel de un TIMP particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de un TIMP tal como TIMP-1 en una muestra de suero o de plasma están disponibles de, por ejemplo, Alpco Diagnostics (Salem, NH), Calbiochem (San Diego, CA), Invitrogen (Camarillo, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA) y R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN).

#### I. Globulinas

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos una globulina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "globulina" incluye cualquier miembro de una serie heterogénea de familias de proteínas del suero que migran menos que la albúmina durante la electroforesis del suero. La electroforesis de proteínas se usa normalmente para clasificar globulinas en las tres siguientes categorías: alfa-globulinas (es decir, alfa-1-globulinas o alfa-2-globulinas); beta-globulinas; y gamma-globulinas.

Las alfa-globulinas comprenden un grupo de proteínas globulares en plasma que son altamente móviles en disoluciones alcalinas o eléctricamente cargadas. Generalmente funcionan inhibiendo cierta actividad de proteasas en sangre e inhibidora. Ejemplos de alfa-globulinas incluyen, pero no se limitan a, alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-MG), haptoglobina (Hp), orosomucoide, alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-2-antiplasmina, antitrombina, ceruloplasmina, cofactor II de heparina, proteína de unión a retinol y transcortina. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de  $\alpha$ 2-MG, haptoglobina y/u orosomucoide. En ciertos casos se determinan uno o más alotipos de haptoglobina tales como, por ejemplo, precursor de Hp, Hp $\beta$ , Hp $\alpha$ 1 y Hp $\alpha$ 2.

En ciertos casos, la presencia o nivel de una globulina particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una globulina particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una globulina tal como  $\alpha$ 2-MG, haptoglobina o orosomucoide en una muestra de suero, plasma o de orina están disponibles de, por ejemplo, GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA) y/o Immundiagnostik AG (Bensheim, Alemania)

#### J. Proteínas de corte de actina

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos una proteína de corte de actina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "proteína de corte de actina" incluye cualquier miembro de una familia de proteínas que participan en la remodelación y regulación de actina de la motilidad celular. Ejemplos no limitantes de proteínas de corte de actina incluyen gelsolina (también conocida como brevina o factor despolimerizante de actina), vilina, fragmina y adseverina. Por ejemplo, la gelsolina es una proteína de leucocitos, plaquetas y otras células que corta filamentos de actina en presencia de calcio submicromolar, aislando así geles de actina citoplásmica.

En ciertos casos, la presencia o nivel de una proteína de corte de actina particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una proteína de corte de actina particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Técnicas de ELISA adecuadas para determinar la presencia o nivel de una proteína de corte de actina tal como gelsolina en una muestra de plasma se describen en, por ejemplo, Smith et ál., J. Lab. Clin. Med., 110:189-195 (1987); y Hiyoshi et ál., Biochem. Mol. Biol. Int., 32:755-762 (1994).

#### K. Proteínas S100

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos una proteína S100 en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "proteína S100" incluye cualquier miembro de una familia de proteínas ácidas de baja masa molecular caracterizada por expresión específica tipo célula y la presencia de 2 dominios de unión al calcio de la mano EF. Hay al menos 21 tipos diferentes de proteínas S100 en seres humanos. El nombre se deriva del hecho de que las proteínas S100 son el 100 % solubles en sulfato de amonio a pH neutro. La mayoría de las proteínas S100 son homodímeros, que consisten en dos polipéptidos idénticos mantenidos juntos por enlaces no covalentes. Aunque las proteínas S100 son estructuralmente similares a la calmodulina, se diferencian en que son específicas de célula, expresadas en células particulares a diferentes niveles dependiendo de factores medioambientales. Las proteínas S100 normalmente están presentes en células derivadas de la cresta neural (por ejemplo, células de Schwann, melanocitos, células de la glía), condrocitos, adipocitos, células mioepiteliales, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas y queratinocitos. Las proteínas S100 participan en una variedad de funciones intracelulares y extracelulares tales como la regulación de la fosforilación de proteínas, factores de transcripción, homeostasis del Ca<sup>2+</sup>, la dinámica de constituyentes del citoesqueleto, actividades enzimáticas, crecimiento y diferenciación celular, y la respuesta inflamatoria.

La calgranulina es una proteína S100 que se expresa en múltiples tipos de células, que incluyen células epiteliales

renales y neutrófilos, y son abundantes en monocitos y granulocitos infiltrantes en condiciones de inflamación crónica. Ejemplos de calgranulinas incluyen, sin limitación, calgranulina A (también conocida como S100A8 o MRP-8), calgranulina B (también conocida como S100A9 o MRP-14) y calgranulina C (también conocida como S100A12).

5 En ciertos casos, la presencia o nivel de una proteína S100 particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una proteína S100 particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una proteína S100 tal como calgranulina A (S100A8) o calgranulina B (S 100A9)  
10 en una muestra de suero, plasma o de orina están disponibles de, por ejemplo, Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA) y Hycult biotechnology b.v. (Uden, Los Países Bajos).

La calprotectina, el complejo de S100A8 y S100A9, es una proteína de unión al calcio y cinc en el citosol de neutrófilos, monocitos y queratinocitos. La calprotectina es una proteína importante en granulocitos y macrófagos neutrófilos y explica nada menos que el 60 % de la proteína total en la fracción de citosol en estas células. Es, por tanto, un marcador sustituto de la reposición de neutrófilos. Su concentración en heces se correlaciona con la intensidad de infiltración de neutrófilos de la mucosa intestinal y con la gravedad de la inflamación. En algunos casos, la calprotectina puede medirse con un ELISA usando pequeñas muestras fecales (50-100 mg) (véase, por ejemplo, Johne et ál., Scand J Gastroenterol., 36:291-296 (2001)).

#### 20 L. Taquiquininas

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de al menos una taquiquinina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "taquiquinina" incluye neuropéptidos amidados que comparten la secuencia del extremo carboxi Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Las taquiquininas normalmente se unen a uno o más receptores de taquiquinina (por ejemplo, TACR1, TACR2 y/o TACR3).

En ciertos aspectos, la presencia o nivel de al menos una taquiquinina que incluye, pero no se limita a, sustancia P, neuroquinina A y neuroquinina B se determina en una muestra. Preferentemente, se determina la presencia o nivel de sustancia P. La sustancia P es un péptido de 11 aminoácidos de longitud que es liberada por terminaciones nerviosas en tanto los sistemas nerviosos centrales como periféricos. Entre los numerosos sitios biológicos inervados por las neuronas liberadoras de sustancia P están la piel, intestinos, estómago, vejiga y sistema cardiovascular.

35 En ciertos casos, la presencia o nivel de una taquiquinina particular se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de una taquiquinina particular se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de una taquiquinina tal como sustancia P en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, MD Biosciences Inc. (St. Paul, MN), Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI), R&D Systems, Inc. (Mineápolis, MN), Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO) y Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI).

#### 40 M. Grelina

45 También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de grelina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "grelina" incluye un péptido de 28 aminoácidos que es un ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR) y participa en la regulación de la liberación de hormonas del crecimiento. La grelina puede acilarse, normalmente con un grupo n-octanoilo en el residuo de serina tres, para formar grelina activa. Alternativamente, la grelina puede existir como una forma sin acilar (es decir, desacil-grelina). La grelina se expresa principalmente en células de enterocromafines especializadas localizadas principalmente en la mucosa del fondo del estómago y tiene efectos metabólicos opuestos a aquellos de la leptina. La grelina estimula el consumo de alimentos, potencia el uso de hidratos de carbono y reduce la utilización de grasa, aumenta la motilidad gástrica y la secreción de ácidos, y reduce la actividad locomotora.

55 En ciertos casos, la presencia o nivel de grelina se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de grelina se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de grelina activa o desacil-grelina en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, Alpco Diagnostics (Salem, NH), Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI), LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO) y Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX).

#### 60 N. Neurotensina

65 También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de neurotensina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "neurotensina" incluye un tridecapéptido que se distribuye

ampliamente por todo el sistema nervioso central y el tubo gastrointestinal. La neurotensina se ha identificado como un importante mediador en el desarrollo y progresión de varias funciones gastrointestinales y condiciones de enfermedad, ejerciendo sus efectos interaccionando con receptores específicos que actúan directamente o indirectamente sobre los nervios, células epiteliales y/o células de los sistemas inmunitarios e inflamatorias (véase, por ejemplo, Zhao et ál., *Peptides*, 27:2434-2444 (2006)).

En ciertos casos, la presencia o nivel de neurotensina se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de neurotensina se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Técnicas de ELISA adecuadas para determinar la presencia o nivel de neurotensina en una muestra se describen en, por ejemplo, Davis et ál., *J. Neurosci. Methods*, 14:15-23 (1985); y Williams et ál., *J. Histochem. Cytochem.*, 37:831-841 (1989).

O. Hormona liberadora de corticotropina

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de hormona liberadora de corticotropina (CRH; también conocida como factor liberador de corticotropina o CRF) en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "hormona liberadora de corticotropina, "CRH", "factor liberador de corticotropina" o "CRF" incluye un péptido de 41 aminoácidos secretado por el núcleo paraventricular del hipotálamo que media en la parte proximal de la respuesta al estrés en mamíferos tales como seres humanos. La CRH normalmente se une a uno o más receptores de la hormona liberadora de corticotropina (por ejemplo, CRHR1 y/o CRHR2). La CRH se expresa por el hipotálamo, médula espinal, estómago, bazo, duodeno, glándula suprarrenal y placenta.

En ciertos casos, la presencia o nivel de CRH se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de CRH se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Kits de ELISA adecuados para determinar la presencia o nivel de CRH en una muestra de suero, plasma, saliva o de orina están disponibles de, por ejemplo, Alpcos Diagnostics (Salem, NH) y Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokio, Japón).

P. Anticuerpos anti-neutrófilos

También es útil en la presente invención la determinación de niveles de ANCA y/o la presencia o ausencia de pANCA en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos" o "ANCA" incluye anticuerpos dirigidos a componentes citoplásmicos y/o nucleares de los neutrófilos. La actividad de ANCA puede dividirse en varias amplias categorías basadas en el patrón de tinción de ANCA en neutrófilos: (1) tinción de neutrófilos citoplásmicos sin selección perinuclear (cANCA); (2) tinción perinuclear alrededor del borde exterior del núcleo (pANCA); (3) tinción perinuclear alrededor del borde interior del núcleo (NSNA); y (4) tinción difusa con motitas a través de todo el neutrófilo (SAPPA). En ciertos casos, la tinción de pANCA es sensible a tratamiento con DNasa. El término ANCA engloba todas las variedades de reactividad anti-neutrófilo que incluyen, pero no se limita a, cANCA, pANCA, NSNA y SAPPA. Similarmente, el término ANCA engloba todos los isotipos de inmunoglobulina que incluyen, sin limitación, inmunoglobulina A y G.

Los niveles de ANCA en una muestra de un individuo pueden determinarse, por ejemplo, usando un inmunoensayo tal como un ensayo de adsorción (ELISA) con neutrófilos fijados con alcohol. La presencia o ausencia de una categoría particular de ANCA tal como pANCA puede determinarse, por ejemplo, usando un ensayo inmunohistoquímico tal como un ensayo de anticuerpo fluorescente indirecto (IFA). Preferentemente, la presencia o ausencia de pANCA en una muestra se determina usando un ensayo de inmunofluorescencia con neutrófilos fijados tratados con DNasa. Además de neutrófilos fijados, antígenos específicos para ANCA que son adecuados para determinar niveles de ANCA incluyen, sin limitación, extractos de neutrófilos sin purificar o parcialmente purificados; proteínas purificadas, fragmentos de proteínas o péptidos sintéticos tales como histona H1 o fragmentos reactivos de ANCA de los mismos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.074.835); antígenos similares a histona H1, antígenos de purina, antígenos bacteroides, o fragmentos reactivos de ANCA de los mismos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.033.864); antígenos vesiculares secretores o fragmentos reactivos de ANCA de los mismos (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. n.º 08/804.106); y anticuerpos idiotípicos anti-ANCA. Un experto en la materia apreciará que el uso de antígenos adicionales específicos para ANCA está dentro del alcance de la presente invención.

Q. Anticuerpos anti-Saccharomyces cerevisiae

También es útil en la presente invención la determinación de niveles de ASCA (por ejemplo, ASCA-IgA y/o ASCA-IgG) en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina A anti-Saccharomyces cerevisiae" o "ASCA-IgA" incluye anticuerpos del isotipo inmunoglobulina A que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*. Similarmente, el término "inmunoglobulina G anti-Saccharomyces cerevisiae" o "ASCA-IgG" incluye anticuerpos del isotipo inmunoglobulina G que reaccionan específicamente con *S. cerevisiae*.

La determinación de si una muestra es positiva o no para ASCA-IgA o ASCA-IgG se hace usando un antígeno específico para ASCA. Un antígeno tal puede ser cualquier antígeno o mezcla de antígenos que se una específicamente por ASCA-IgA y/o ASCA-IgG. Aunque los anticuerpos para ASCA se caracterizaron inicialmente por su capacidad para unirse a *S. cerevisiae*, aquellos expertos en la materia entenderán que un antígeno que se une específicamente por ASCA puede obtenerse de *S. cerevisiae* o de una variedad de otras fuentes, mientras que el antígeno puede unirse específicamente a anticuerpos ASCA. Por consiguiente, fuentes a modo de ejemplo de un antígeno específico para ASCA, que pueden usarse para determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra incluyen, sin limitación, células de levadura muertas completas tales como células de *Saccharomyces* o de *Candida*; manano de la pared celular de levadura tal como fosfopeptidomanano (PPM); oligosacáridos tales como oligomanósidos; neoglicolípidos; anticuerpos idiotípicos anti-ASCA; y similares. Diferentes especies y cepas de levadura, tales como la cepa de *S. cerevisiae* Su1, Su2, CBS 1315 o BM 156, o la cepa de *Candida albicans* VW32, son adecuadas para su uso como un antígeno específico para ASCA-IgA y/o ASCA-IgG. Antígenos purificados y sintéticos específicos para ASCA también son adecuados para su uso en determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Ejemplos de antígenos purificados incluyen, sin limitación, antígenos de oligosacáridos purificados tales como oligomanósidos. Ejemplos de antígenos sintéticos incluyen, sin limitación, oligomanósidos sintéticos tales como aquellos descritos en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20030105060, por ejemplo, D-Man  $\beta$ (1-2) D-Man  $\beta$ (1-2) D-Man  $\beta$ (1-2) D-Man-OR, D-Man  $\alpha$ (1-2) D-Man  $\alpha$ (1-2) D-Man  $\alpha$ (1-2) D-Man-OR y D-Man  $\alpha$ (1-3) D-Man  $\alpha$ (1-2) D-Man  $\alpha$ (1-2) D-Man-OR, en las que R es un átomo de hidrógeno, un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub> o un grupo conector opcionalmente marcado.

Las preparaciones de mananos de la pared celular de levadura, por ejemplo, PPM, pueden usarse en determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Tales antígenos de superficie solubles en agua pueden prepararse por cualquier técnica de extracción apropiada conocida en la técnica, que incluye, por ejemplo, por esterilización en autoclave, o pueden obtenerse comercialmente (véase, por ejemplo, Lindberg et ál., *Gut*, 33:909-913 (1992)). La fracción soluble en ácido de PPM también es útil en los algoritmos estadísticos de la presente invención (Sendid et ál., *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3:219-226 (1996)). Un PPM a modo de ejemplo que es útil en determinar niveles de ASCA en una muestra se deriva de la cepa de *S. uvarum* ATCC n.º 38926.

Antígenos de oligosacáridos purificados tales como oligomanósidos también pueden ser útiles en determinar los niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Los antígenos de oligosacáridos purificados se convierten preferentemente en neoglicolípidos como se describe en, por ejemplo, Faille et ál., *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:438-446 (1992). Un experto en la materia entiende que la reactividad de un antígeno de oligomanósido tal con ASCA puede optimizarse variando la longitud de cadena del manosilo (Frosh et ál., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1194-1198 (1985)); la configuración anomérica (Fukazawa et ál., en "Immunology of Fungal Disease", E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pág. 37-62 (1989); Nishikawa et ál., *Microbiol. Immunol.*, 34:825-840 (1990); Poulain et ál., *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 23:46-52 (1993); Shibata et ál., *Arch. Biochem. Biophys.*, 243:338-348 (1985); Trinel et ál., *Infect. Immun.*, 60:3845-3851 (1992)); o la posición del enlace (Kikuchi et ál., *Planta*, 190:525-535 (1993)).

Oligomanósidos adecuados para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, sin limitación, un oligomanósido que tiene la manotetraosa Man(1-3) Man(1-2) Man(1-2) Man. Un oligomanósido tal puede purificarse a partir de PPM como se describe en, por ejemplo, Faille et ál., arriba. Un neoglicolípido a modo de ejemplo específico para ASCA puede construirse liberando el oligomanósido de su PPM respectivo y acoplándose posteriormente el oligomanósido liberado a 4-hexadecilanilina o similares.

#### R. Anticuerpos antimicrobianos

También es útil en la presente invención la determinación de niveles de anticuerpo anti-OmpC en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-proteína C de la membrana externa" o "anticuerpo anti-OmpC" incluye anticuerpos dirigidos a una proteína de la membrana externa bacteriana como se describe en, por ejemplo, la publicación de patente PCT n.º WO 01/89361. El término "proteína C de la membrana externa" o "OmpC" se refiere a una proteína bacteriana que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-OmpC.

El nivel de anticuerpo anti-OmpC presente en una muestra de un individuo puede determinarse usando una proteína OmpC o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Antígenos de OmpC adecuados útiles en determinar niveles de anticuerpo anti-OmpC en una muestra incluyen, sin limitación, una proteína OmpC, un polipéptido OmpC que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína OmpC, o un fragmento de la misma, tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Como se usa en el presente documento, un polipéptido OmpC generalmente describe polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con más de aproximadamente el 50 % de identidad, preferentemente más de aproximadamente el 60 % de identidad, más preferentemente más de aproximadamente el 70 % de identidad, todavía más preferentemente más de aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos con una proteína OmpC, con la identidad de aminoácidos determinada usando un programa de alineamiento de secuencias tales como CLUSTALW. Tales antígenos pueden prepararse, por ejemplo, por purificación de bacterias entéricas tales como *E. coli*, por expresión recombinante de un ácido nucleico tal como

n.º de acceso de GenBank K00541, por medios sintéticos tales como síntesis de péptidos en disolución o fase sólida, o usando expresión en fago.

5 También es útil en la presente invención la determinación de niveles de anticuerpo anti-I2 en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-I2" incluye anticuerpos dirigidos a un antígeno microbiano que comparte homología con reguladores transcripcionales bacterianos como se describe en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.309.643. El término "I2" se refiere a un antígeno microbiano que es inmunorreactivo con un anticuerpo anti-I2. La proteína I2 microbiana es un polipéptido de 100 aminoácidos que comparte alguna homología de similitud débil con la proteína 4 predicha de *C. pasteurianum*, Rv3557c de *Mycobacterium tuberculosis* y un regulador transcripcional de *Aquifex aeolicus*. Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas para la proteína I2 se describen en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.309.643.

15 El nivel de anticuerpo anti-I2 presente en una muestra de un individuo puede determinarse usando una proteína I2 o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Antígenos I2 adecuados útiles en determinar los niveles de anticuerpo anti-I2 en una muestra incluyen, sin limitación, una proteína I2, un polipéptido I2 que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína I2, o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Tales polipéptidos I2 presentan mayor similitud de secuencias con la proteína I2 que con la proteína 4 de *C. pasteurianum* e incluyen variantes de isotipo y homólogos de las mismas. Como se usa en el presente documento, un polipéptido I2 generalmente describe polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con más de aproximadamente el 50 % de identidad, preferentemente más de aproximadamente el 60 % de identidad, más preferentemente más de aproximadamente el 70 % de identidad, todavía más preferentemente más de aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos con una proteína I2 que se produce naturalmente, con la identidad de aminoácidos determinada usando un programa de alineamiento de secuencias tal como CLUSTALW. Tales antígenos I2 pueden prepararse, por ejemplo, por purificación de microbios, por expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica un antígeno I2, por medios sintéticos tales como síntesis de péptidos en disolución o fase sólida, o usando expresión en fago.

30 También es útil en la presente invención la determinación de niveles de anticuerpos anti-flagelina en una muestra. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-flagelina" incluye anticuerpos dirigidos a un componente de proteína de flagelos bacterianos como se describe en, por ejemplo, la publicación de patente PCT n.º WO 03/053220 y la publicación de patente de EE. UU. n.º 20040043931. El término "flagelina" se refiere a una proteína de flagellum bacteriano que es inmunorreactiva con un anticuerpo anti-flagelina. Las flagelinas microbianas son proteínas encontradas en flagellum bacteriano que se disponen ellas mismas en un cilindro hueco para formar el filamento.

40 El nivel de anticuerpo anti-flagelina presente en una muestra de un individuo puede determinarse usando una proteína flagelina o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Antígenos de flagelina adecuados útiles en determinar los niveles de anticuerpo anti-flagelina en una muestra incluyen, sin limitación, una proteína flagelina tal como flagelina Cbir-1, flagelina X, flagelina A, flagelina B, fragmentos de las mismas, y combinaciones de las mismas, un polipéptido de flagelina que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína de flagelina, o un fragmento de la misma tal como un fragmento inmunorreactivo de la misma. Como se usa en el presente documento, un polipéptido de flagelina generalmente describe polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con más de aproximadamente el 50 % de identidad, preferentemente más de aproximadamente el 60 % de identidad, más preferentemente más de aproximadamente el 70 % de identidad, todavía más preferentemente más de aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos con una proteína flagelina que se produce naturalmente, con la identidad de aminoácidos determinada usando un programa de alineamiento de secuencias tal como CLUSTALW. Tales antígenos de flagelina pueden prepararse, por ejemplo, por purificación de bacteria tal como *Helicobacter bilis*, *Helicobacter mustelae*, *Helicobacter pylori*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y bacteria encontrada en el ciego, por expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica un antígeno de flagelina, por medios sintéticos tales como síntesis de péptidos en disolución o fase sólida, o usando expresión en fago.

#### 55 S. Otros marcadores de diagnóstico

60 La determinación de la presencia o nivel de lactoferrina en una muestra también es útil en la presente invención. En ciertos casos, la presencia o nivel de lactoferrina se detecta al nivel de expresión de ARNm con un ensayo tal como, por ejemplo, un ensayo de hibridación o un ensayo basado en amplificación. En ciertos otros casos, la presencia o nivel de lactoferrina se detecta al nivel de expresión de proteínas usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) o un ensayo inmunohistoquímico. Un kit de ELISA de lactoferrina disponible de Calbiochem (San Diego, CA) puede usarse para detectar lactoferrina humana en una muestra de plasma, orina, lavado broncoalveolar o líquido cefalorraquídeo. Similarmente, un kit de ELISA disponible de U.S. Biological (Swampscott, MA) puede usarse para determinar el nivel de lactoferrina en una muestra de plasma. La publicación de patente de EE. UU. n.º 20040137536 describe un ensayo de ELISA para determinar la presencia de elevados niveles de lactoferrina en una muestra de heces. Asimismo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 20040033537 describe un ensayo de ELISA para determinar la concentración de lactoferrina endógena en una muestra de heces, moco o bilis. En algunas



realizaciones, entonces la presencia o nivel de anticuerpos anti-lactoferrina puede detectarse en una muestra usando, por ejemplo, proteína lactoferrina o un fragmento de la misma.

Inmunoensayos tales como ELISA también son particularmente útiles para determinar la presencia o nivel de proteína C reactiva (CRP) en una muestra. Por ejemplo, un ensayo de ELISA colorimétrico de sándwich disponible de Alpco Diagnostics (Salem, NH) puede usarse para determinar el nivel de CRP en una muestra de suero, plasma, orina o de heces. Similarmente, un kit de ELISA disponible de Biomedica Corporation (Foster City, CA) puede usarse para detectar niveles de CRP en una muestra. Otros procedimientos para determinar niveles de CRP en una muestra se describen en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.838.250 y 6.406.862; y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 20060024682 y 20060019410.

Además, hemocult, sangre oculta fecal, es frecuentemente indicativa de enfermedad gastrointestinal y se han desarrollado diversos kits para monitorizar la hemorragia gastrointestinal. Por ejemplo, Hemocult SENSA, un producto de Beckman Coulter, es una ayuda al diagnóstico para hemorragia gastrointestinal, deficiencia de hierro, úlceras pépticas, colitis ulcerosa y, en algunos casos, en el cribado de cáncer colorrectal. Este ensayo particular se basa en la oxidación de guayacol por peróxido de hidrógeno para producir un color azul. Un ensayo colorimétrico similar está comercialmente disponible de Helena Laboratories (Beaumont, TX) para la detección de sangre en muestras de heces. Otros procedimientos para detectar sangre oculta en una muestra de heces determinando la presencia o nivel de hemoglobina o actividad de hemo se describen en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.277.250, 4.920.045, 5.081.040 y 5.310.684.

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia o nivel de fibrinógeno o un producto proteolítico del mismo tal como un fibrinopéptido en una muestra. El fibrinógeno es una glicoproteína del plasma sintetizada en el hígado compuesta por 3 subunidades estructuralmente diferentes: alfa (FGA); beta (FGB); y gamma (FGG). La trombina produce una proteólisis limitada de la molécula de fibrinógeno, durante la cual los fibrinopéptidos A y B son liberados de las regiones del extremo N de las cadenas alfa y beta, respectivamente. Los fibrinopéptidos A y B, que se han secuenciado en muchas especies, pueden tener una función fisiológica como vasoconstrictores y pueden ayudar en la homeostasis local durante la coagulación de la sangre. En una realización, el fibrinopéptido A humano comprende la secuencia: Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg (SEC ID N.º: 1). En otra realización, el fibrinopéptido B humano comprende la secuencia: Glp-Gly-Val-Asn-Asp-Asn-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg (SEC ID N.º: 2). Puede usarse un kit de ELISA disponible de American Diagnostica Inc. (Stamford, CT) para detectar la presencia o nivel de fibrinopéptido A humano en plasma u otros fluidos biológicos.

En ciertas realizaciones, la determinación de la presencia o nivel de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) en una muestra es útil en la presente invención. La calcitonina es una hormona peptídica de 32 aminoácidos sintetizada por las células parafoliculares de la tiroides. Produce la reducción en calcio en el suero, un efecto opuesto al de la hormona paratiroidea. La CGRP se deriva, con la calcitonina, del gen CT/CGRP localizado sobre el cromosoma 11. La CGRP es un péptido de 37 aminoácidos y es un potente vasodilatador endógeno. La CGRP se produce principalmente en tejido nervioso; sin embargo, sus receptores se expresan en todo el cuerpo. Puede usarse un kit de ELISA disponible de Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI) para detectar la presencia o nivel de CGRP humana en una variedad de muestras que incluyen plasma, suero, tejido nervioso, CSF y medios de cultivo.

En otras realizaciones, la determinación de la presencia o nivel de un anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (tTG) en una muestra es útil en la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo anti-tTG" incluye cualquier anticuerpo que reconozca transglutaminasa tisular (tTG) o un fragmento de la misma. Las transglutaminasas son una variada familia de enzimas dependientes del  $Ca^{2+}$  que son ubicuas y altamente conservadas a lo largo de las especies. De todas las transglutaminasas, la tTG es la más ampliamente distribuida. En ciertos casos, el anticuerpo anti-tTG es un anticuerpo anti-IgA de tTG, anticuerpo anti-IgG de tTG, o mezclas de los mismos. Puede usarse un kit de ELISA disponible de ScheBo Biotech USA Inc. (Marietta, GA) para detectar la presencia o nivel de anticuerpos anti-IgA de tTG humanos en una muestra de sangre.

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia de polimorfismos en el gen NOD2/CARD15 en una muestra. Por ejemplo, polimorfismos en el gen NOD2 tales como una variante de nucleótido C2107T que produce una variante de proteína R703W pueden identificarse en una muestra de un individuo (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 20030190639). En una realización alternativa pueden usarse niveles de ARNm de NOD2 como marcador de diagnóstico de la presente invención para ayudar en la clasificación de SII.

También es útil en la presente invención la determinación de la presencia de polimorfismos en el gen transportador de la recaptación de serotonina (SERT) en una muestra. Por ejemplo, polimorfismos en la región promotora del gen SERT tienen efectos sobre la actividad transcripcional, produciendo eficiencia de recaptación de 5-HT alterada. Se ha mostrado que se observó una fuerte asociación genotípica entre la delección/genotipo de delección de SERT-P y el fenotipo de SII (véase, por ejemplo, Yeo Gut, 53:1396-1399 (2004)). En una realización alternativa, los niveles de ARNm de SERT pueden usarse como marcador de diagnóstico de la presente invención para ayudar en la

clasificación de SII (véase, por ejemplo, Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(5 Suppl.): S184-193 (2005)).

En ciertos aspectos, el nivel de ARNm de triptófano hidroxilasa-1 es un marcador de diagnóstico. Por ejemplo, se ha mostrado que el ARNm de triptófano hidroxilasa-1 se reduce significativamente en SII (véase, por ejemplo, Coats, Gastroenterology, 126:1897-1899 (2004)). En ciertos otros aspectos, una prueba de respiración de lactulosa para medir metano, que es indicativo de crecimiento bacteriano excesivo, puede usarse como marcador de diagnóstico para SII.

Marcadores de diagnóstico adicionales incluyen, pero no se limitan a, L-selectina/CD62L, autoanticuerpos de 70 kDa anti-U1, zona ocluyente 1 (ZO-1), péptido intestinal vasoactivo (VIP), amiloide A en suero, gastrina, polimorfismos del gen NB3, polimorfismos del gen NCI1, leucocitos fecales, polimorfismos de los genes adrenorreceptores  $\alpha$ 2A y  $\alpha$ 2C, polimorfismos del gen IL-10, polimorfismos del gen TNF- $\alpha$ , polimorfismos del gen TGF- $\beta$ , receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, proteínas G, polimorfismos del gen 5-HT<sub>2A</sub>, polimorfismos del gen 5-HTT LPR, polimorfismos del gen receptor de 5-HT<sub>4</sub>, zonulina y el péptido 33-mero (Shan et ál., Science, 297:2275-2279 (2002); publicación de patente PCT n.º WO 03/068170).

#### VI. Marcadores de clasificación

Una variedad de marcadores de clasificación son adecuados para su uso en los procedimientos, sistemas y código de la presente invención para clasificar SII en una categoría, forma o subtipo clínico tal como, por ejemplo, SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI). Ejemplos de marcadores de clasificación incluyen, sin limitación, cualquiera de los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente (por ejemplo, leptina, transportador de la recaptación de serotonina (SERT), triptófano hidroxilasa-1, 5-hidroxitriptamina (5-HT), triptasa, PGE<sub>2</sub>, histamina y similares), además de proteína 8 de la mucosa antral, queratina-8, claudina-8, zonulina, receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR1), receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR2) y similares.

Por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2 más adelante ilustran que el medir los niveles de  $\beta$ -triptasa es particularmente útil para distinguir muestras de pacientes con SII-E de muestras de pacientes con SII-A y SII-D. Similarmente, el Ejemplo 1 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, presentada el 14 de agosto de 2007, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines, ilustra que medir los niveles de leptina es particularmente útil para distinguir muestras de pacientes con SII-E de muestras de pacientes con SII-A y SII-D. Además, se ha mostrado que la expresión de SERT y de triptófano hidroxilasa-1 de la mucosa disminuye en SII-E y SII-D (véase, por ejemplo, Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(5 Suppl):S184-193 (2005)). Además, los pacientes con SII-E muestran liberación de 5-HT postprandial alterada, mientras que los pacientes con SII-PI tienen mayores niveles pico de 5-HT (véase, por ejemplo, Dunlop, Clin Gastroenterol Hepatol., 3:349-357 (2005)). Además, como puede apreciarse en la figura 11, los niveles en suero de histamina y PGE<sub>2</sub> también son particularmente útiles para distinguir muestras de pacientes con SII-D de muestras de pacientes con SII-A, SII-E y de control sanos.

#### VII. Ensayos y kits

Puede usarse cualquiera de una variedad de ensayos, técnicas y kits conocidos en la técnica para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra para clasificar si la muestra está asociada o no a SII.

La presente invención se basa, en parte, en determinar la presencia o nivel de al menos un marcador en una muestra obtenida de un individuo. Como se usa en el presente documento, el término "determinar la presencia de al menos un marcador" incluye determinar la presencia de cada marcador de interés usando cualquier ensayo cuantitativo o cualitativo conocido para un experto en la materia. En ciertos casos, ensayos cualitativos que determinan la presencia o ausencia de un rasgo, variable o sustancia bioquímica o serológica particular (por ejemplo, proteína o anticuerpo) son adecuados para detectar cada marcador de interés. En ciertos otros casos, ensayos cuantitativos que determinan la presencia o ausencia de ARN, proteína, anticuerpo o actividad son adecuados para detectar cada marcador de interés. Como se usa en el presente documento, el término "determinar el nivel de al menos un marcador" incluye determinar el nivel de cada marcador de interés usando cualquier ensayo cuantitativo directo o indirecto conocido para un experto en la materia. En ciertos casos, ensayos cuantitativos que determinan, por ejemplo, la cantidad relativa o absoluta de ARN, proteína, anticuerpo o actividad son adecuados para determinar el nivel de cada marcador de interés. Un experto en la materia apreciará que cualquier ensayo útil para determinar el nivel de un marcador también es útil para determinar la presencia o ausencia del marcador.

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. Un fragmento inmunológicamente activo tal contiene las regiones variables de la cadena pesada y ligera, que constituyen la porción 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')<sub>2</sub> se incluye dentro del significado del término anticuerpo.

Puede usarse citometría de flujo para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Tales ensayos de citometría de flujo, que incluyen inmunoensayos basados en perlas, pueden usarse para determinar, por ejemplo, niveles de marcadores de anticuerpo del mismo modo que se describe para detectar anticuerpos del suero para *Candida albicans* y proteínas del VIH (véanse, por ejemplo, Bishop y Davis, *J. Immunol. Methods*, 210:79-87 (1997); McHugh et ál., *J. Immunol. Methods*, 116:213 (1989); Scillian et ál., *Blood*, 73:2041 (1989)).

También puede usarse tecnología de expresión en fago para expresar un antígeno recombinante específico para un marcador para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Las partículas de fago que expresan un antígeno específico para, por ejemplo, un marcador de anticuerpo pueden anclarse, si se desea, a una placa de múltiples pocillos usando un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal anti-fago (Felici et ál., "Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera" en Abelson (Ed.), *Methods in Enzymol.*, 267, San Diego: Academic Press, Inc. (1996)).

Una variedad de técnicas de inmunoensayo, que incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos, pueden usarse para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra (véase, por ejemplo, Self y Cook, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:60-65 (1996)). El término inmunoensayo engloba técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), ELISA de captura de antígeno, ELISA de sándwich, ELISA de captura de anticuerpo para IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoensayos de polarización de la fluorescencia (FPIA); y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, tales inmunoensayos pueden automatizarse. Los inmunoensayos también pueden usarse conjuntamente con fluorescencia inducida por láser (véase, por ejemplo, Schmalzing y Nashabeh, *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 ál., *J. Immunol. Methods*, 204:105-133 (1997)). Además, ensayos de nefelometría, en los que la formación de complejos de proteína/anticuerpo produce elevada dispersión de la luz que se convierte en una señal de velocidad pico en función de la concentración de marcador, son adecuados para su uso en la presente invención. Los ensayos de nefelometría están comercialmente disponibles de Beckman Coulter (Brea, CA; kit n.º 449430) y pueden realizarse usando un analizador de nefelómetro Behring (Fink et ál., *J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem.*, 27:261-276 (1989)).

El ELISA de captura de antígeno puede ser útil para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Por ejemplo, en un ELISA de captura de antígeno, un anticuerpo dirigido a un marcador de interés se une a una fase sólida y se añade muestra de forma que el marcador sea unido por el anticuerpo. Después de eliminarse las proteínas no unidas lavando, la cantidad de marcador unido puede cuantificarse usando, por ejemplo, un radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988)). El ELISA de sándwich también puede ser adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, en un ensayo de sándwich de dos anticuerpos, un primer anticuerpo se une a un soporte sólido y se deja que el marcador de interés se una al primer anticuerpo. La cantidad de marcador se cuantifica midiendo la cantidad de un segundo anticuerpo que se une al marcador. Los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos de microtítulo), trozos de un material de sustrato sólido o membrana (por ejemplo, plástico, nailon, papel), y similares. Puede prepararse una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Esta tira puede luego sumergirse en la muestra de prueba y procesarse rápidamente mediante lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como una mancha coloreada.

Un radioinmunoensayo usando, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125 (<sup>125</sup>I) (Harlow y Lane, arriba) también es adecuado para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Un anticuerpo secundario marcado con un marcador quimioluminiscente también puede ser adecuado para su uso en la presente invención. Un ensayo de quimioluminiscencia usando un anticuerpo secundario quimioluminiscente es adecuado para la detección no radiactiva sensible de niveles de marcador. Tales anticuerpos secundarios pueden obtenerse comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, IL).

Los inmunoensayos descritos anteriormente son particularmente útiles para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Como ejemplo no limitante, un ELISA usando una molécula de unión a IL-8 tal como un anticuerpo anti-IL-8 o una proteína de unión a IL-8 extracelular (por ejemplo, receptor de IL-8) es útil para determinar si una muestra es positiva o no para la proteína IL-8 o para determinar niveles de proteína IL-8 en una muestra. Un ELISA de neutrófilos fijados es útil para determinar si una muestra es positiva o no para ANCA o para determinar niveles de ANCA en una muestra. Similarmente, un ELISA usando fosfopeptidomano de pared de células de levadura es útil para determinar si una muestra es positiva o no para ASCA-IgA y/o ASCA-IgG, o para determinar niveles de ASCA-IgA y/o ASCA-IgG en una muestra. Un ELISA usando proteína OmpC o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva o no para anticuerpos anti-OmpC, o para determinar niveles de anticuerpo anti-OmpC en una muestra. Un ELISA usando proteína I2 o un fragmento de la misma es útil

para determinar si una muestra es positiva o no para anticuerpos anti-I2, o para determinar niveles de anticuerpo anti-I2 en una muestra. Un ELISA usando proteína flagelina (por ejemplo, flagelina Cbir-1) o un fragmento de la misma es útil para determinar si una muestra es positiva o no para anticuerpos anti-flagelina, o para determinar niveles de anticuerpo anti-flagelina en una muestra. Además, los inmunoensayos descritos anteriormente son particularmente útiles para determinar la presencia o nivel de otros marcadores de diagnóstico en una muestra.

La unión inmunológica específica del anticuerpo al marcador de interés puede detectarse directamente o indirectamente. Marcas directas incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y similares, unidas al anticuerpo. Puede usarse un anticuerpo marcado con yodo-125 (<sup>125</sup>I) para determinar los niveles de uno o más marcadores en una muestra. Un ensayo de quimioluminiscencia usando un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador es adecuado para la detección no radiactiva 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. Los anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana-FITC está disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, CA).

Marcas indirectas incluyen diversas enzimas muy conocidas en la técnica, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (FA), β-galactosidasa, ureasa y similares. Puede usarse un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que da un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Puede usarse un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que da un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. Similarmente, puede usarse un sistema de detección de β-galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), que da un producto soluble detectable a 410 nm. Puede usarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como urea-púrpura de bromocresol (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO). Un anticuerpo secundario útil ligado a una enzima puede obtenerse de varias fuentes comerciales, por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana-fosfatasa alcalina puede comprarse de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.).

Puede analizarse una señal de la marca directa o indirecta, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar radiación tal como un contador gamma para la detección de <sup>125</sup>I; o un fluorímetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Para la detección de anticuerpos ligados a enzima puede hacerse un análisis cuantitativo de la cantidad de niveles de marcador usando un espectrofotómetro tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, CA) según las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención pueden automatizarse o realizarse robóticamente, y la señal de múltiples muestras puede detectarse simultáneamente.

También puede usarse transferencia Western cuantitativa para detectar o determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. Las transferencias Western pueden cuantificarse por procedimientos muy conocidos tales como densitometría de barrido o detección y cuantificación de la radiactividad. Como ejemplo no limitante, muestras de proteína se someten a electroforesis sobre 10 % de geles de Laemmli de SDS-PAGE. Se hacen reaccionar anticuerpos monoclonales murinos primarios con la transferencia, y la unión del anticuerpo puede confirmarse que es lineal usando un experimento de transferencia por ranuras preliminar. Se usan anticuerpos de cabra acoplados a anti-peroxidasa de rábano picante de ratón (BioRad) como anticuerpo secundario, y la detección de señales se realiza usando quimioluminiscencia, por ejemplo, con el kit de quimioluminiscencia Renaissance (New England Nuclear; Boston, MA) según las instrucciones del fabricante. Las autorradiografías de las transferencias se analizan usando un densitómetro de barrido (Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA) y se normalizan a un control positivo. Se informan valores, por ejemplo, como una relación entre el valor real con respecto al control positivo (Índice densitométrico). Tales procedimientos son muy conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en Parra et ál., J. Vasc. Surg., 28:669-675 (1998).

Alternativamente puede usarse una variedad de técnicas de ensayo inmunohistoquímico para determinar la presencia o nivel de uno o más marcadores en una muestra. El término ensayo inmunohistoquímico engloba técnicas que utilizan la detección visual de colorantes fluorescentes o enzimas acopladas (es decir, conjugadas) con anticuerpos que reaccionan con el marcador de interés usando microscopía fluorescente o microscopía óptica e incluye, sin limitación, ensayo de anticuerpo fluorescente directo, ensayo de anticuerpo fluorescente indirecto (IFA), inmunofluorescencia anti-complemento, inmunofluorescencia de avidina-biotina y ensayos de inmunoperoxidasa. Un ensayo de IFA, por ejemplo, es útil para determinar si una muestra es positiva o no para ANCA, el nivel de ANCA en una muestra, si una muestra es positiva o no para pANCA, el nivel de pANCA en una muestra, y/o un patrón de tinción de ANCA (por ejemplo, patrón de tinción de cANCA, pANCA, NSNA y/o SAPPa). La concentración de ANCA en una muestra puede cuantificarse, por ejemplo, mediante valoración del punto final o mediante medida de la intensidad de fluorescencia visual en comparación con un patrón de referencia conocido.

Alternativamente, la presencia o nivel de un marcador de interés puede determinarse detectando o cuantificando la cantidad del marcador purificado. La purificación del marcador puede lograrse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), sola o en combinación con espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI/EM,

MALDI-TOF/EM, SELDI-TOF/EM, EM en tándem, etc.). La detección cualitativa o cuantitativa de un marcador de interés también puede determinarse por procedimientos muy conocidos que incluyen, sin limitación, ensayos de Bradford, tinción con azul de Coomassie, tinción con plata, ensayos para proteína radiomarcada y espectrometría de masas.

5 El análisis de una pluralidad de marcadores puede llevarse a cabo por separado o simultáneamente con una muestra de prueba. Para ensayo separado o secuencial de marcadores, aparatos adecuados incluyen analizadores de laboratorio clínicos tales como los sistema de inmunoensayo ElecSys (Roche), AxSym (Abbott), Access (Beckman), ADVIA<sup>®</sup>, CENTAUR<sup>®</sup> (Bayer) y NICHOLS ADVANTAGE<sup>®</sup> (Nichols Institute). Aparatos o chips de proteína preferidos realizan ensayos simultáneos de una pluralidad de marcadores sobre una única superficie. 10 Formatos físicos particularmente útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones direccionables discretas para la detección de una pluralidad de marcadores diferentes. Tales formatos incluyen micromatrices de proteína, o "chips de proteína" (véase, por ejemplo, Ng et ál., J. Cell Mol. Med., 6:329-340 (2002)) y ciertos dispositivos capilares (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.019.944). En estas realizaciones, 15 cada localización superficial discreta puede comprender anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección en cada localización. Las superficies pueden comprender alternativamente una o más partículas discretas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en localizaciones discretas de una superficie, en las que las micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección.

20 Además de los ensayos anteriormente descritos para determinar la presencia o nivel de diversos marcadores de interés, el análisis de niveles de ARNm de marcador usando técnicas rutinarias tales como análisis Northern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o cualquier otro procedimiento basado en hibridación con una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a una porción de la secuencia codificante del marcador (por ejemplo, hibridación por transferencia por ranuras) también están dentro del alcance de la 25 presente invención. Técnicas de amplificación por PCR aplicables se describen en, por ejemplo, Ausubel et ál., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York (1999), Capítulo 7 y Suplemento 47; Theophilus et ál., "PCR Mutation Detection Protocols", Humana Press, (2002); e Innis et ál., PCR Protocols, San Diego, Academic Press, Inc. (1990). Los procedimientos generales de hibridación de ácidos nucleicos se describen en Anderson, "Nucleic Acid Hybridization", BIOS Scientific Publishers, 1999. La amplificación o hibridación de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos transcritas (por ejemplo, ARNm o ADNc) también puede realizarse a partir de secuencias de ARNm o ADNc dispuestas en una micromatriz. Los procedimientos de micromatriz se describen generalmente en Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts", DNA Press, 2003; y Baldi et ál., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling", Cambridge University Press, 2002.

35 El análisis del genotipo de un marcador tal como un marcador genético puede realizarse usando técnicas conocidas en la técnica que incluyen, sin limitación, análisis basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de secuencias y análisis electroforético. Un ejemplo no limitante de un análisis basado en PCR incluye un ensayo de discriminación alélica Taqman<sup>®</sup> disponible de Applied Biosystems. Ejemplos no limitantes de análisis de secuencias 40 incluyen secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación de Sanger, secuenciación de ADN en matriz capilar, secuenciación de ciclo térmico (Sears et ál., Biotechniques, 13:626-633 (1992)), secuenciación en fase sólida (Zimmerman et ál., Methods Mol. Cell Biol., 3:39-42 (1992)), secuenciación con espectrometría de masas tal como espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS; Fu et ál., Nature Biotech., 16:381-384 (1998)) y secuenciación por hibridación (Chee et ál., Science, 274:610-614 (1996); Drmanac et ál., Science, 260:1649-1652 (1993); Drmanac et ál., Nature Biotech., 16:54-58 (1998)). Ejemplos no limitantes de análisis electroforéticos incluyen electroforesis en gel en placa tal como electroforesis en gel de 45 agarosa o poliacrilamida, electroforesis capilar y electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante. Otros procedimientos para genotipar un individuo en un sitio polimórfico en un marcador incluyen, por ejemplo, el ensayo INVADER<sup>®</sup> de Third Wave Technologies, Inc., análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), hibridación de oligonucleótidos específica de alelos, un ensayo de movilidad de heterodúplex y análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP).

Varios marcadores de interés pueden combinarse en una prueba para el procesamiento eficaz de múltiples muestras. Además, un experto en la materia reconocería el valor de probar múltiples muestras (por ejemplo, en 55 momentos de tiempo sucesivos, etc.) del mismo sujeto. Tal prueba de muestras en serie puede permitir la identificación de cambios en los niveles de marcador con el tiempo. El aumento o disminución en los niveles de marcador, además de la ausencia de cambio en los niveles de marcador, también puede proporcionar información útil para clasificar SII o para descartar enfermedades y trastornos asociados a síntomas similares al SII.

60 Un panel para medir uno o más de los marcadores descritos anteriormente puede construirse para proporcionar información relevante relacionada con el enfoque de la presente invención para clasificar una muestra como que está asociada a SII. Un panel tal puede construirse para determinar la presencia o nivel de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 o más marcadores individuales. El análisis de un único marcador o subconjuntos de marcadores también puede llevarse a cabo por un experto en la materia en diversos ámbitos clínicos. Éstos incluyen, pero no se limitan a, ámbitos ambulatorio, de atención de urgencias leves, atención de 65 urgencias críticas, cuidados intensivos, unidad de monitorización, pacientes hospitalizados, pacientes ambulatorios,

consulta del médico, clínica médica y de exámenes médicos.

El análisis de marcadores también podría llevarse a cabo en una variedad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización podría usarse para facilitar el procesamiento de grandes números de muestras de prueba. Alternativamente, podrían desarrollarse formatos de muestras individuales para facilitar oportunamente el tratamiento y diagnóstico.

VIII. Algoritmos estadísticos

En algunos aspectos, la presente invención proporciona procedimientos, ensayos, sistemas y código para clasificar si una muestra está asociada o no a SII usando un algoritmo estadístico o procedimiento para clasificar la muestra como una muestra de SII o muestra sin SII. En otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos, sistemas y código para clasificar si una muestra está asociada o no a SII usando un primer algoritmo estadístico o procedimiento para clasificar la muestra como una muestra sin EII o muestra de EII (es decir, etapa de descarte de EII), seguido de un segundo algoritmo estadístico o procedimiento para clasificar la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII (es decir, etapa de confirmación de SII). Preferentemente, los algoritmos o procedimientos estadísticos comprenden independientemente uno o más sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. Como se describe en el presente documento, una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos proporciona ventajosamente sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y/o exactitud global mejorados para clasificar si una muestra está asociada o no a SII. En una realización preferida, los procedimientos, ensayos, sistemas y código proporcionados en el presente documento usan una combinación de al menos dos algoritmos estadísticos.

En algunas realizaciones, el primer algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos seleccionado del grupo que consiste en un clasificador de bosques aleatorios (RF), árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles reforzados, redes neuronales (NN), máquinas de vectores de soporte (SVM), modelos de detector automático de interacciones de chi al cuadrado generales, árboles interactivos, curvas paramétricas de regresión multiadaptativas, de aprendizaje de máquinas, y combinaciones de los mismos. En ciertos casos, el primer algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único. Preferentemente, el sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único comprende un algoritmo estadístico basado en árboles tal como un RF o C&RT. En ciertos otros casos, el primer algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos, por ejemplo, usados en tándem o en paralelo. Como ejemplo no limitante, un RF puede usarse primero para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcadores de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y una NN (por ejemplo, NN artificial) puede entonces usarse para clasificar la muestra como una muestra sin EII o muestra de EII basándose en el valor de predicción o probabilidad y el mismo perfil de marcadores de diagnóstico o diferente o combinación de perfiles. El sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos híbrido RF/NN de la presente invención normalmente clasifica la muestra como una muestra sin EII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o exactitud global de al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %.

En ciertas realizaciones, el segundo algoritmo estadístico comprende cualquiera de los sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos descritos anteriormente. En ciertos casos, el segundo algoritmo estadístico es un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único tal como, por ejemplo, un algoritmo estadístico basado en árboles (por ejemplo, RF o C&RT). En ciertos otros casos, el segundo algoritmo estadístico es una combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos, por ejemplo, usados en tándem o en paralelo. Como ejemplo no limitante, un RF pueden primero usarse para generar un valor de predicción o probabilidad basado en el perfil de marcadores de diagnóstico, solo o en combinación con un perfil de síntomas, y una NN (por ejemplo, NN artificial) o SVM puede entonces usarse para clasificar la muestra sin EII como una muestra sin SII o muestra de SII basándose en el valor de predicción o probabilidad y el mismo perfil de marcadores de diagnóstico o diferente, o combinación de perfiles. El sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos híbrido RF/NN o RF/SVM descrito en el presente documento normalmente clasifica la muestra como una muestra de SII con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o exactitud global de al menos aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %.

En algunos casos, los datos obtenidos de usar el sistema o sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos pueden procesarse usando un algoritmo de procesamiento. Un algoritmo de procesamiento tal puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en un algoritmo de perceptrón multicapa, de redes de propagación hacia atrás y de Levenberg-Marquardt. En otros casos puede usarse una combinación de tales algoritmos de procesamiento, tal como en un modo en paralelo o en serie.

El término “algoritmo estadístico” o “procedimiento estadístico” incluye cualquiera de una variedad de análisis estadísticos usados para determinar relaciones entre variables. En la presente invención, las variables son la presencia o nivel de al menos un marcador de interés y/o la presencia o gravedad de al menos un síntoma relacionado con SII. Cualquier número de marcadores y/o síntomas puede analizarse usando un algoritmo

estadístico descrito en el presente documento. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, o más biomarcadores y/o síntomas, pueden incluirse en un algoritmo estadístico. En una realización se usa regresión logística. En otra realización se usa regresión lineal. En ciertos casos, los algoritmos estadísticos de la presente invención pueden usar una medición de cuantiles de un marcador particular dentro de una población dada como variable. Los cuantiles son un conjunto de “puntos de corte” que dividen una muestra de datos en grupos que contienen (en la medida de lo posible) números iguales de observaciones. Por ejemplo, los cuantiles son valores que dividen una muestra de datos en cuatro grupos que contienen (en la medida de lo posible) números iguales de observaciones. El cuartil inferior es el valor de datos un cuarto hacia arriba a través del conjunto de datos ordenado; el cuartil superior es el valor de datos un cuarto hacia abajo a través del conjunto de datos ordenado. Los quintiles son valores que dividen una muestra de datos en cinco grupos que contienen (en la medida de lo posible) números iguales de observaciones. La presente invención también puede incluir el uso de intervalos de percentiles de niveles de marcador (por ejemplo, terciles, cuantiles, quintiles, etc.), o sus índices acumulados (por ejemplo, sumas de cuantiles de niveles de marcador, etc.) como variables en los algoritmos (precisamente como con variables continuas).

Preferentemente, los algoritmos estadísticos de la presente invención comprenden uno o más sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos. Como se usa en el presente documento, el término “sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos” incluye una técnica algorítmica de aprendizaje de máquinas capaz de adaptarse a conjuntos de datos complejos (por ejemplo, panel de marcadores de interés y/o lista de síntomas relacionados con SII) y tomar decisiones basadas en tales conjuntos de datos. En algunas realizaciones se usa un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único tal como un árbol de clasificación (por ejemplo, bosque aleatorio). En otras realizaciones se usa una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos, preferentemente en tándem. Ejemplos de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que usan árboles de aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación tales como bosques aleatorios, árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles reforzados, etc.), aprendizaje probablemente aproximadamente correcto (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (ANN), redes neurodifusas (NFN), estructuras de redes, perceptrones tales como perceptrones multicapa, redes de propagación hacia atrás multicapa, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en redes de creencias, etc.), aprendizaje por refuerzo (por ejemplo, aprendizaje pasivo en un entorno conocido tal como aprendizaje inexperto, aprendizaje dinámico adaptativo y aprendizaje por diferencias temporales, aprendizaje pasivo en un entorno desconocido, aprendizaje activo en un entorno desconocido, funciones de acción-valor del aprendizaje, aplicaciones de aprendizaje por refuerzo, etc.), y algoritmos genéticos y programación evolutiva. Otros sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos incluyen máquinas de vectores de soporte (por ejemplo, procedimientos de Kernel), curvas paramétricas de regresión adaptativa multifactorial (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas de gaussianas, algoritmos de descenso del gradiente y cuantificación vectorial del aprendizaje (LVQ).

Los bosques aleatorios son sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos que se construyen usando un algoritmo desarrollado por Leo Breiman y Adele Cutler. Los bosques aleatorios usan un gran número de árboles de decisión individuales y deciden la clase eligiendo el modo (es decir, el que se produce más frecuentemente de las clases como se ha determinado por los árboles individuales). El análisis de bosques aleatorios puede realizarse, por ejemplo, usando el software RandomForests disponible de Salford Systems (San Diego, CA). Véase, por ejemplo, Breiman, Machine Learning, 45:5-32 (2001); y [http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc\\_home.htm](http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htm), para una descripción de bosques aleatorios.

Los árboles de clasificación y regresión representan una alternativa basada en ordenador para ajustar modelos de regresión clásicos y normalmente se usan para determinar el mejor modelo posible para una respuesta categórica o continua de interés basada en una o más variables independientes. El análisis de árboles de clasificación y regresión puede realizarse, por ejemplo, usando el software CART disponible de Salford Systems o el software de análisis de datos Estadística de StatSoft, Inc. (Tulsa, OK). Una descripción de árboles de clasificación y regresión se encuentra, por ejemplo, en Breiman et ál. “Classification and Regression Trees” Chapman y Hall, New York (1984); y Steinberg et ál., “CART: Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis”, Salford Systems, San Diego, (1995).

Las redes neuronales son grupos interconectados de neuronas artificiales que usan un modelo matemático o computacional para el procesamiento de información basado en un enfoque conexionista a la computación. Normalmente, las redes neuronales son sistemas adaptativos que cambian su estructura basándose en información externa o interna que circula a través de la red. Ejemplos específicos de redes neuronales incluyen redes neuronales de alimentación hacia adelante tales como perceptrones, perceptrones de una sola capa, perceptrones multicapa, redes de propagación hacia atrás, redes ADALINE, redes MADALINE, redes Learnmatrix, redes de función de base radial (RBF) y mapas auto-organizados o redes auto-organizadas de Kohonen; redes neuronales recurrentes tales como redes recurrentes simples y redes de Hopfield; redes neuronales estocásticas tales como máquinas de Boltzmann; redes neuronales modulares tales como comité de máquinas y redes neuronales asociativas; y otros tipos de redes tales como redes neuronales instantáneamente entrenadas, redes neuronales de impulsos, redes neuronales dinámicas y redes neuronales en cascada. El análisis de redes neuronales puede realizarse, por ejemplo, usando el software de análisis de datos Estadística disponible de StatSoft, Inc. Véase, por ejemplo, Freeman et ál., en “Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques”, Addison-Wesley Publishing

Company (1991); Zadeh, *Information and Control*, 8:338-353 (1965); Zadeh, "IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics", 3:28-44 (1973); Gersho et ál., en "Vector Quantization and Signal Compression", Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, Londres (1992); y Hassoun, "Fundamentals of Artificial Neural Networks", MIT Press, Cambridge, Massachusetts, Londres (1995), para una descripción de redes neuronales.

Las máquinas de vectores de soporte son un conjunto de técnicas de aprendizaje supervisadas relacionadas usadas para la clasificación y regresión y se describen, por ejemplo, en Cristianini et ál., "An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods", Cambridge University Press (2000). El análisis de máquinas de vectores de soporte puede realizarse, por ejemplo, usando el software SVM<sup>light</sup> desarrollado por Thorsten Joachims (Universidad de Cornell) o usando el software LIBSVM desarrollado por Chih-Chung Chang y Chih-Jen Lin (Universidad Nacional de Taiwán).

Los sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos descritos en el presente documento pueden entrenarse y probarse usando una cohorte de muestras (por ejemplo, muestras serológicas) de los individuos sanos, pacientes con SII, pacientes con EII y/o pacientes con celiaquía. Por ejemplo, muestras de pacientes diagnosticados por un médico, y preferentemente por un gastroenterólogo, como que tienen EII usando una biopsia, colonoscopia, o un inmunoensayo como se describe en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.218.129, son adecuadas para su uso en entrenar y probar los sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos de la presente invención. Las muestras de pacientes diagnosticados con EII también pueden estratificarse en enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa usando un inmunoensayo como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.750.355 y 5.830.675. Las muestras de pacientes diagnosticados con SII usando un criterio publicado tal como los criterios de diagnóstico de Manning, Roma I, Roma II o Roma III son adecuadas para su uso en entrenar y probar los sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos de la presente invención. Las muestras de individuos sanos pueden incluir aquellas que no se identificaron como muestras de EII y/o SII. Un experto en la materia conocerá técnicas y criterios de diagnóstico adicionales para obtener una cohorte de muestras de pacientes que pueden usarse en entrenar y probar los sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "sensibilidad" se refiere a la probabilidad de que un procedimiento de diagnóstico, sistema o código de la presente invención dé un resultado positivo cuando la muestra es positiva, por ejemplo, que tiene SII. La sensibilidad se calcula como el número de resultados positivos verdaderos dividido entre la suma de los positivos verdaderos y negativos falsos. La sensibilidad es esencialmente una medida de cómo de bien un procedimiento, sistema o código de la presente invención identifica correctamente aquellos con SII de aquellos sin la enfermedad. Los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse de forma que la sensibilidad de clasificar SII sea al menos de aproximadamente el 60 %, y puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 65 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En realizaciones preferidas, la sensibilidad de clasificar SII es de al menos aproximadamente el 90 % cuando se usa una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos (véase el Ejemplo 10 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines) o al menos aproximadamente el 85 % cuando se usa un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único (véase, Ejemplo 11 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines).

El término "especificidad" se refiere a la probabilidad de que un procedimiento de diagnóstico, sistema o código de la presente invención dé un resultado negativo cuando la muestra no es positiva, por ejemplo, que no tiene SII. La especificidad se calcula como el número de resultados negativos verdaderos dividido entre la suma de los negativos verdaderos y positivos falsos. La especificidad es esencialmente una medida de cómo de bien un procedimiento, sistema o código de la presente invención excluye aquellos que no tienen SII de aquellos que tienen la enfermedad. Los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse de forma que la especificidad de clasificar SII sea al menos aproximadamente el 70 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En realizaciones preferidas, la especificidad de clasificar SII es al menos aproximadamente el 86 % cuando se usa una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos (véase, Ejemplo 10 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines) o al menos aproximadamente el 84 % cuando se usa un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos único (véase el Ejemplo 11 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines).

Como se usa en el presente documento, el término "valor predictivo negativo" o "VPN" se refiere a la probabilidad de que un individuo identificado como que no tiene SII en realidad no tiene la enfermedad. El valor predictivo negativo puede calcularse como el número de negativos verdaderos dividido entre la suma de los negativos verdaderos y negativos falsos. El valor predictivo negativo se determina por las características del procedimiento de diagnóstico, sistema o código, además de la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse de forma que el valor predictivo negativo en una población que tiene una prevalencia de enfermedad esté en el intervalo de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99 % y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %,



87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En realizaciones preferidas, el valor predictivo negativo de clasificar SII es al menos aproximadamente el 87 % cuando se usa una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos (véase el Ejemplo 10 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines).

El término “valor predictivo positivo” o “VPP” se refiere a la probabilidad de que un individuo identificado como que tiene SII en realidad tiene la enfermedad. El valor predictivo positivo puede calcularse como el número de positivos verdaderos dividido entre la suma de los positivos verdaderos y los positivos falsos. El valor predictivo positivo se determina por las características del procedimiento de diagnóstico, sistema o código, además de la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse de forma que el valor predictivo positivo en una población que tiene una prevalencia de enfermedad esté en el intervalo de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99 % y puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En realizaciones preferidas, el valor predictivo positivo de clasificar SII es al menos aproximadamente el 90 % cuando se usa una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos (véase el Ejemplo 10 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines).

Los valores predictivos, que incluyen valores predictivos negativos y positivos, están influidos por la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. En los procedimientos, sistemas y código de la presente invención, los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse para producir un parámetro clínico deseado para una población clínica con una prevalencia de SII particular. Por ejemplo, sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos pueden seleccionarse para una prevalencia de SII de hasta aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o el 70 %, que puede observarse, por ejemplo, en un consultorio médico tal como un consultorio de gastroenterólogo o un consultorio del médico de familia.

Como se usa en el presente documento, el término “acuerdo global” o “exactitud global” se refiere a la exactitud con la que un procedimiento, sistema o código de la presente invención clasifica un estado de enfermedad. La exactitud global se calcula como la suma de los positivos verdaderos y negativos verdaderos dividida entre el número total de resultados de muestras y está afectada por la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. Por ejemplo, los algoritmos estadísticos pueden seleccionarse de forma que la exactitud global en una población de pacientes que tiene una prevalencia de enfermedad sea de al menos aproximadamente el 60 %, y pueda ser, por ejemplo, al menos aproximadamente el 65 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %. En realizaciones preferidas, la exactitud global de clasificar SII es de al menos aproximadamente el 80 % cuando se usa una combinación de sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos (véase el Ejemplo 10 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines).

#### IX. Sistema de clasificación de la enfermedad

La figura 13 ilustra un sistema de clasificación de la enfermedad (SCE) (200) según una realización de la presente invención. Como se muestra en su interior, un SCE incluye un módulo de inteligencia de SCE (205), tal como un ordenador, que tiene un procesador (215) y módulo de memoria (210). El módulo de inteligencia también incluye módulos de comunicación (no mostrados) para transmitir y recibir información mediante una o más conexiones directas (por ejemplo, USB, Firewire u otra interfaz) y una o más conexiones de red (por ejemplo, que incluyen un módem u otro dispositivo de interfaz de red). El módulo de memoria puede incluir dispositivos de memoria interna y uno o más dispositivos de memoria externa. El módulo de inteligencia también incluye un módulo de visualización (225), tal como un monitor o impresora. En un aspecto, el módulo de inteligencia recibe datos tales como resultados de pruebas del paciente de un módulo de adquisición de datos tal como un sistema de prueba (250), tanto mediante una conexión directa como mediante una red (240). Por ejemplo, el sistema de prueba puede configurarse para ejecutar pruebas de múltiples analitos en una o más muestras del paciente (255) y proporcionar automáticamente los resultados de las pruebas al módulo de inteligencia. Los datos también pueden proporcionarse al módulo de inteligencia mediante la entrada directa por un usuario o pueden descargarse de un medio portátil tal como un disco compacto (EC) o un disco versátil digital (DVD). El sistema de prueba puede integrarse con el módulo de inteligencia, directamente acoplado al módulo de inteligencia, o puede acoplarse remotamente con el módulo de inteligencia mediante la red. El módulo de inteligencia también puede comunicar datos a y de uno o más sistemas de cliente (230) mediante la red como es muy sabido. Por ejemplo, un médico solicitante o profesional médico puede obtener y visualizar un informe del módulo de inteligencia, que puede estar residente en un laboratorio u hospital, usando un sistema de cliente (230).

La red puede ser una LAN (red de área local), WAN (red de área amplia), red inalámbrica, red punto a punto, red en estrella, red en anillo de paso de testigo, red concentrada u otra configuración. Como el tipo más común de red en el uso actual es una red TCP/IP (protocolo de control de transferencia y protocolo de internet), tal como la red de internet global de redes frecuentemente denominadas “Internet” con una “I” en mayúsculas que se usará en muchos

de los ejemplos en el presente documento, pero debe entenderse que las redes que la presente invención podría usar no están así limitadas, aunque el TCP/IP es el protocolo actualmente preferido.

Varios elementos en el sistema mostrado en la figura 2 de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524 pueden incluir elementos convencionales muy conocidos que no necesitan explicarse aquí en detalle. Por ejemplo, el módulo de inteligencia podría implementarse como un ordenador personal de sobremesa, estación de trabajo, ordenador central, ordenador portátil, etc. Cada sistema de cliente podría incluir un ordenador personal de sobremesa, estación de trabajo, ordenador portátil, PDA, teléfono móvil, o cualquier dispositivo habilitado para WAP o cualquier otro dispositivo informático que pueda conectarse directamente o indirectamente a internet u otra conexión de red. Un sistema de cliente normalmente ejecuta un cliente HTTP, por ejemplo, un programa navegador, tal como el navegador Internet Explorer™ de Microsoft, el navegador Navigator™ de Netscape, el navegador Opera o un navegador habilitado para WAP en el caso de un teléfono móvil, PDA u otro dispositivo inalámbrico, o similares, que permite que un usuario del sistema de cliente acceda, procese y visualice información y páginas disponibles para él del módulo de inteligencia mediante la red. Cada sistema de cliente también incluye normalmente uno o más dispositivos de interfaz de usuario tales como un teclado, un ratón, pantalla táctil, bolígrafo o similares para interaccionar con un interfaz gráfica de usuario (GUI) proporcionada por el navegador sobre una pantalla (por ejemplo, pantalla de monitor, pantalla LCD, etc.) (235) conjuntamente con páginas, formularios y otra información proporcionada por el módulo de inteligencia. Como se trata anteriormente, la presente invención es adecuada para su uso con internet, que se refiere a una red de internet global específica de redes. Sin embargo, debe entenderse que pueden usarse otras redes en lugar de internet, tal como una intranet, una extranet, una red privada virtual (VPN), una red no basada en TCP/IP, cualquier LAN o WAN, o similares.

Según una realización, cada sistema de cliente y todos sus componentes son configurables por el operador usando aplicaciones tales como un navegador, que incluye ejecución de código informático usando una unidad de procesamiento central tal como un procesador Intel® Pentium® o similares. Similarmente, el módulo de inteligencia y todos sus componentes podrían ser configurables por el operador usando aplicación (aplicaciones) que incluye(n) ejecución de código informático usando una unidad de procesamiento central (215) tal como un procesador Intel Pentium o similares, o unidades de múltiples procesadores. El código informático que opera y que configura el módulo de inteligencia para procesar datos y resultados de pruebas como se describe en el presente documento se descarga preferentemente y se guarda en un disco duro, pero el código del programa entero, o porciones del mismo, también pueden almacenarse en cualquier otro medio o dispositivo de memoria volátil o no volátil como es muy conocido, tal como una ROM o RAM, o proporcionarse sobre cualquier otro medio legible por ordenador (260) que pueda guardar el código de programa, tal como un medio de disco compacto (EC), medio de disco versátil digital (DVD), un disquete, ROM, RAM y similares.

El código informático que implementa diversos aspectos y realizaciones de la presente invención puede implementarse en cualquier lenguaje de programación que pueda ejecutarse en un sistema de ordenador tal como, por ejemplo, en C, C++, C#, HTML, Java, JavaScript, o cualquier otro lenguaje de encriptación, tal como VBScript. Adicionalmente, el código de programa entero, o porciones del mismo, puede integrarse como una señal portadora, que puede transmitirse y descargarse de una fuente de software (por ejemplo, servidor) mediante internet, o mediante cualquier otra conexión de red convencional como es muy conocido (por ejemplo, extranet, VPN, LAN, etc.) usando cualquier medio de comunicación y protocolos (por ejemplo, TCP/IP, HTTP, HTTPS, Ethernet, etc.) como son muy conocidos.

Según una realización, el módulo de inteligencia implementa un procedimiento de clasificación de enfermedades para analizar resultados de pruebas de pacientes y/o respuestas de cuestionarios para determinar si una muestra de paciente está asociada o no a SII. Los datos pueden guardarse en una o más tablas de datos u otras estructuras lógicas de datos en la memoria (210) o en un almacenamiento separado o sistema de base de datos acoplado al módulo de inteligencia. Uno o más procedimientos estadísticos se aplican normalmente a un conjunto de datos que incluyen datos de prueba para un paciente particular. Por ejemplo, los datos de pruebas podrían incluir un perfil de marcadores de diagnóstico que comprende datos que indican la presencia o nivel de al menos un marcador en una muestra del paciente. Los datos de pruebas podrían también incluir un perfil de síntomas, que comprende datos que indican la presencia o gravedad de al menos un síntoma asociado a SII que el paciente está experimentando o ha experimentado recientemente. En un aspecto, un procedimiento estadístico produce una decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra del paciente como una muestra de SII o muestra sin SII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y/o perfil de síntomas. En otro aspecto, un primer procedimiento estadístico produce una primera decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra de paciente como una muestra de EII o muestra sin EII basándose en el perfil de marcadores de diagnóstico y/o perfil de síntomas. Si la muestra de paciente se clasifica como una muestra sin EII, un segundo procedimiento estadístico se aplica al mismo conjunto de datos o uno diferente para producir una segunda decisión estadísticamente derivada que clasifica la muestra sin EII como una muestra de SII o muestra sin SII. La primera y/o la segunda decisión estadísticamente derivada puede mostrarse sobre un dispositivo de muestra asociado a o acoplado al módulo de inteligencia, o la(s) decisión (decisiones) puede(n) proporcionarse a y mostrarse en un sistema separado, por ejemplo, un sistema de cliente (230). Los resultados mostrados permiten que un médico haga un diagnóstico o pronóstico razonado.

## X. Terapia y monitorización terapéutica

Una vez se ha clasificado una muestra de un individuo como una muestra de SII, los procedimientos, sistemas y código de la presente invención pueden comprender además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para tratar uno o más síntomas asociados a SII (es decir, un fármaco para SII). Para aplicaciones terapéuticas, el fármaco para SII puede administrarse solo o co-administrarse en combinación con uno o más fármacos para SII adicionales y/o uno o más fármacos que reducen los efectos secundarios asociados al fármaco para SII.

Los fármacos para SII pueden administrarse con un excipiente farmacéutico adecuado según sea necesario y puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los modos aceptados de administración. Así, la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intra-articular, parenteral, intra-arterial, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, o ser inhalación. Por "co-administrar" se indica que un fármaco para SII se administra al mismo tiempo, justo antes de o justo después de la administración de un segundo fármaco (por ejemplo, otro fármaco para SII, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios del fármaco para SII, etc.).

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para SII puede administrarse repetidamente, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces, o la dosis puede administrarse por infusión continua. La dosis puede tomar la forma de sólido, semi-sólido, polvo liofilizado, o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, pellas, cápsulas, polvos, disoluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas, o similares, preferentemente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la simple administración de dosificaciones precisas.

Como se usa en el presente documento, el término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco para SII calculada para producir la aparición, tolerabilidad y/o efectos terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, pueden prepararse formas de dosificación más concentradas, a partir de las cuales pueden entonces producirse formas de dosificación unitaria más diluidas. Las formas de dosificación más concentradas contendrán así sustancialmente más de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad del fármaco para SII.

Procedimientos de preparación de tales formas de dosificación son conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación normalmente incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y adicionalmente pueden incluir otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeación de tejidos, solubilizantes y similares. Excipientes apropiados pueden adaptarse a la forma de dosificación particular y vía de administración mediante procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, arriba).

Ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como carbopoles, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxi-benzoatos (es decir, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; edulcorantes; y aromatizantes. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas de polímeros biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para administración por vía oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, disoluciones, jarabes, esprays, pastillas para chupar, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Excipientes adecuados para administración por vía oral incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz toma la forma de una píldora, comprimido o cápsula y, así, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco para SII, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como un almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. Un fármaco para SII también puede formularse en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Las formas de dosificación líquidas pueden prepararse disolviendo o dispersando un fármaco para SII y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, solución

salina acuosa (por ejemplo, 0,9 % en peso/volumen de cloruro sódico), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una disolución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica o intravenosa. Un fármaco para SII también puede formularse en un enema de retención.

5 Para administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, gelatinas, disoluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos. Para administración por inhalación, un fármaco para SII puede administrarse como un polvo seco o en forma líquida mediante un nebulizador. Para administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de disoluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Preferentemente, las disoluciones inyectables se formulan a un  
10 pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

La dosis terapéuticamente eficaz también puede proporcionarse en una forma liofilizada. Tales formas de dosificación pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para la reconstitución antes de la administración, o el tampón puede incluirse en la forma de dosificación liofilizada para reconstitución con, por ejemplo, agua. La forma  
15 de dosificación liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La forma de dosificación liofilizada puede proporcionarse en una jeringuilla, opcionalmente envasada en combinación con el tampón para reconstitución, de forma que la forma de dosificación reconstituida pueda administrarse inmediatamente a un individuo.

20 En el uso terapéutico para el tratamiento de SII, un fármaco para SII puede administrarse a la dosificación inicial de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg al día. Puede usarse un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Sin embargo, las dosificaciones pueden variarse dependiendo de los requisitos del  
25 individuo, la gravedad de los síntomas de SII y el fármaco para SII que se emplea. Por ejemplo, las dosificaciones pueden determinarse empíricamente considerando la gravedad de los síntomas de SII en un individuo clasificado como que tiene SII según los procedimientos descritos en el presente documento. La dosis administrada a un individuo, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para afectar una respuesta terapéutica beneficiosa en el individuo con el tiempo. El tamaño de la dosis también puede determinarse por la existencia,  
30 naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que acompañe la administración de un fármaco para SII particular en un individuo. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la experiencia del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del fármaco para SII. A partir de aquí, la dosificación se aumenta pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo circunstancias. Por comodidad, la dosificación diaria total puede dividirse  
35 y administrarse en porciones durante el día, si se desea.

Como se usa en el presente documento, el término "fármaco para SII" incluye todas las formas farmacéuticamente aceptables de un fármaco que es útil para tratar uno o más síntomas asociados a SII. Por ejemplo, el fármaco para SII puede estar en una mezcla racémica o isomérica, un complejo sólido unido a una resina de intercambio iónico o  
40 similares. Además, el fármaco para SII puede estar en una forma solvatada. El término "fármaco para SII" también pretende incluir todas las sales, derivados y análogos farmacéuticamente aceptables del fármaco para SII que se describen, además de combinaciones de los mismos. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de un fármaco para SII incluyen, sin limitación, las formas de sal de tartrato, succinato, tartarato, bitartrato, diclorhidrato, salicilato, hemisuccinato, citrato, maleato, clorhidrato, carbamato, sulfato, nitrato y benzoato de las mismas, además  
45 de combinaciones de las mismas y similares. Cualquier forma de un fármaco para SII es adecuada para su uso en los procedimientos de la presente invención, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable de un fármaco para SII, una base libre de un fármaco para SII, o una mezcla de los mismos.

Fármacos adecuados que son útiles para tratar uno o más síntomas asociados a SII incluyen, pero no se limitan a,  
50 agentes serotoninérgicos, antidepresivos, activadores de los canales de cloruro, bloqueantes de los canales de cloruro, agonistas de la guanilato ciclasa, antibióticos, opioides, antagonistas de neuroquinina, agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos, alcaloides de belladona, barbitúricos, análogos del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), antagonistas del factor liberador de corticotropina (CRF), probióticos, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones  
55 de los mismos. Otros fármacos para SII incluyen agentes de carga, antagonistas de dopaminas, carminativos, tranquilizantes, dextofisopam, fenitoína, timolol y diltiazem.

Los agentes serotoninérgicos son útiles para el tratamiento de síntomas de SII tales como estreñimiento, diarrea y/o  
60 estreñimiento y diarrea alternos. Ejemplos no limitantes de agentes serotoninérgicos se describen en Cash et ál., Aliment. Pharmacol. Ther., 22:1047-1060 (2005), e incluyen agonistas de receptores de 5-HT<sub>3</sub> (por ejemplo, MKC-733, etc.), agonistas de receptores de 5-HT<sub>4</sub> (por ejemplo, tegaserod (Zelnorm™), prucaloprida, AG1-001, etc.), antagonistas de receptores de 5-HT<sub>3</sub> (por ejemplo, alosetron (Lotronex®), cilansetron, ondansetron, granisetron, dolasetron, ramosetron, palonosetron, E-3620, DDP-225, DDP-733, etc.), antagonistas de receptores de 5-HT<sub>3</sub> /  
65 agonistas de receptores de 5-HT<sub>4</sub> mixtos (por ejemplo, cisaprida, mosaprida, renzaprida, etc.), bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, aminoácidos como glutamina y ácido glutámico que regulan la

permeabilidad intestinal afectando la señalización neuronal o de células de la glía pueden administrarse para tratar pacientes con SII.

Antidepresivos tales como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI) o antidepresivos tricíclicos son particularmente útiles para el tratamiento de síntomas de SII tales como dolor abdominal, estreñimiento y/o diarrea. Ejemplos no limitantes de antidepresivos SSRI incluyen citalopram, fluvoxamina, paroxetina, fluoxetina, sertralina, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Ejemplos de antidepresivos tricíclicos incluyen, pero no se limitan a, desipramina, nortriptilina, protriptilina, amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, trimipramina, maprotilina, amoxapina, clomipramina, bases libres de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los activadores de los canales de cloruro son útiles para el tratamiento de síntomas de SII tales como estreñimiento. Un ejemplo no limitante de un activador de los canales de cloruro es lubiprostona (Amitiza™), una base libre de la misma, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un derivado de la misma, o un análogo de la misma. Además, bloqueantes de los canales de cloruro tales como crofelemer son útiles para el tratamiento de síntomas de SII tales como diarrea. Agonistas de la guanilato ciclase tales como MD-1100 son útiles para el tratamiento de estreñimiento asociado a SII (véase, por ejemplo, Bryant et ál., Gastroenterol., 128:A-257 (2005)). Los antibióticos tales como neomicina también pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento de estreñimiento asociado a SII (véase, por ejemplo, Park et ál., Gastroenterol., 128:A-258 (2005)). Antibióticos no absorbibles como rifaximina (Xifaxan™) son adecuados para tratar el excesivo crecimiento bacteriano del intestino delgado y/o estreñimiento asociado a SII (véase, por ejemplo, Sharara et ál., Am. J. Gastroenterol., 101:326-333 (2006)).

Opioides tales como opioides kappa (por ejemplo, asimadolina) pueden ser útiles para tratar dolor y/o estreñimiento asociado a SII. Los antagonistas de la neuroquinina (NK) tales como talnetant, saredutant, y otros antagonistas de NK2 y/o NK3, pueden ser útiles para tratar síntomas de SII tales como excesiva sensibilidad de los músculos en el colon, estreñimiento y/o diarrea. Agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos tales como dicitolmina pueden ser útiles para tratar síntomas de SII tales como espasmos en los músculos del intestino y la vejiga. Otros agentes antiespasmódicos o anticolinérgicos tales como alcaloides de belladona (por ejemplo, atropina, escopolamina, hiosciamina, etc.) pueden usarse en combinación con barbitúricos tales como fenobarbital para reducir los espasmos del intestino asociados a SII. Análogos de GLP-1 tales como GTP-010 pueden ser útiles para tratar síntomas de SII tales como estreñimiento. Antagonistas de CRF tales como astresina y probióticos tales como VSL#3® pueden ser útiles para tratar uno o más síntomas de SII. Un experto en la materia conocerá fármacos para SII adicionales actualmente en uso o en desarrollo que son adecuados para tratar uno o más síntomas asociados a SII.

Un individuo también puede monitorizarse a intervalos periódicos de tiempo para evaluar la eficacia de una cierta pauta terapéutica una vez una muestra del individuo se ha clasificado como una muestra de SII. Por ejemplo, los niveles de ciertos marcadores cambian basándose en el efecto terapéutico de un tratamiento tal como un fármaco. El paciente se monitoriza para evaluar la respuesta y entender los efectos de ciertos fármacos o tratamientos en un enfoque individualizado. Adicionalmente, los pacientes pueden no responder a un fármaco, pero los marcadores pueden cambiar, sugiriendo que estos pacientes pertenecen a una población especial (no sensible) que puede identificarse por sus niveles de marcador. Estos pacientes pueden suspender su terapia actual y recetárseles tratamientos alternativos.

## XI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

Los ejemplos de la publicación de patente de EE. UU. n.º 2008/0085524 presentada el 14 de agosto de 2007 se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

### A. Ejemplo 1. Un ELISA de triptasa para predecir SII

Este ejemplo describe un ELISA sensible para detectar la presencia o nivel de  $\beta$ -triptasa de mastocitos. Véanse, por tanto, las figuras 1-7.

Antecedentes: Los mastocitos desempeñan una función importante en la patogénesis del síndrome del intestino irritable (SII). La elevada infiltración y activación de mastocitos en segmentos distales del intestino están asociadas a la aparición de síntomas y gravedad de SII. Los mastocitos participan en la elevada respuesta de nervios aferentes viscerales al estímulo mucoso en pacientes con SII. La medición de marcadores de mastocitos puede tener una importante implicación en el diagnóstico clínico de SII. Sin embargo, este esfuerzo se entorpeció debido a la falta de ensayos sensibles.

Procedimientos: Aquí informan los presentes inventores del desarrollo y validación de un ensayo de ELISA de dos sitios altamente sensible para medir el nivel de triptasa en muestras de suero humano (límite de detección 0,019 ng/ml). El ensayo es preciso, robusto y reproducible. La concentración de triptasa en suero en controles sanos y

pacientes con SII se midió usando este ensayo.

Resultados: El nivel de triptasa en suero promedio en controles sanos fue  $9,32 \pm 2,1$  ng/ml (n=156). Pacientes con SII-D y SII-A mostraron mayor concentración de triptasa en suero significativa ( $12,71$  ng/ml (n=209) para SII-D y  $11,94$  ng/ml (n=57) para SII-A,  $p < 0,01$ ); mientras que el nivel de triptasa promedio es  $9,34$  ng/ml (n=118) para SII-E, que no tiene diferencia significativa de controles sanos para SII-E.

Conclusión: Este es el primer biomarcador desarrollado hasta la fecha que diferencia pacientes con SII-D y SII-A de pacientes con SII-E y controles sanos. Combinando el nivel de triptasa en suero con otros biomarcadores de SII de Prometheus, los presentes inventores pudieron mejorar la exactitud de diagnosticar pacientes con SII-D y SII-A.

Se desarrolló un ensayo de ELISA para la determinación del nivel de  $\beta$ -triptasa de mastocitos en suero usando anti-triptasa de conejo como anticuerpo de captura y G3 conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo de detección. El sustrato luminiscente CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)fenilfosfato de disodio) se usó para potenciar la sensibilidad del ensayo. Se observó una curva de dosis-respuesta lineal con respecto al intervalo estándar de 1-1000 ng/ml para  $\beta$ -triptasa en tampón con 5 % de BSA y 10 % de suero humano normal. El límite inferior del ensayo fue 0,019 ng/ml, los coeficientes de variación intranalíticos e interanalíticos fueron inferiores al 15 % a 1 ng/ml y 1000 ng/ml de concentraciones de triptasa. La recuperación de cantidades conocidas de triptasa purificada añadidas al suero fue del 88 %. El inmunoensayo se utilizó para examinar los niveles en suero de triptasa de controles sanos, pacientes con SII-E y SII-D. El nivel de triptasa en suero promedio en control sano fue  $7,0 \pm 2,1$  ng/ml (n=113). El nivel de triptasa promedio en SII-E y SII-D fue  $9,6$  ng/ml (n=116) y  $12,7$  (n=209), respectivamente. Usando el valor de corte de  $11,4$  ng/ml (promedio +2 DE), la especificidad del ensayo por control sano GI fue del 82 % (n=156), la sensibilidad del ensayo para SII-E y SII-D fue 21,5 % y 24,9 %, respectivamente. Combinando con síntomas del paciente y otros marcadores para SII, los niveles de triptasa en suero pueden ayudar a diferenciar SII-D de otros tipos de síndrome del intestino irritable.

#### B. Ejemplo 2. Evaluación de la utilidad diagnóstica de niveles de triptasa en suero en SII

Antecedentes: Los mastocitos desempeñan una función importante en la patogénesis del síndrome del intestino irritable (SII). La elevada infiltración y activación de mastocitos en segmentos distales del intestino están asociadas a la aparición de síntomas y gravedad de SII. Los mastocitos participan en la elevada respuesta de nervios aferentes viscerales al estímulo mucoso en pacientes con SII. La medición de marcadores de mastocitos puede tener importantes implicaciones en el diagnóstico clínico de SII. Sin embargo, este esfuerzo se entorpeció debido a la falta de ensayos sensibles.

Procedimientos: Aquí informan los presentes inventores del desarrollo y validación de un ensayo de ELISA de dos sitios altamente sensible para medir el nivel de triptasa en muestras de suero humano (límite de detección 0,019 ng/ml). El ensayo es preciso, robusto y reproducible. Las concentraciones de triptasa en suero en controles sanos y pacientes con SII se midieron usando este ensayo.

Resultados: El nivel de triptasa en suero promedio en controles sanos fue  $7,1 \pm 2,5$  ng/ml. Pacientes con SII-D y SII-A mostraron mayores concentraciones de triptasa en suero ( $10,3 \pm 8,7$  ng/ml para SII-D y  $12,1 \pm 10,7$  ng/ml para SII-A) que los sujetos sanos de control, mientras que el nivel de triptasa promedio fue  $9,6 \pm 9,4$  ng/ml para SII-E. Hubo una diferencia significativa de niveles de triptasa en suero entre los grupos de SII-E y SII-D ( $p < 0,01$ ).

Conclusión: La concentración de triptasa en suero es el primer biomarcador desarrollado hasta la fecha que diferencia pacientes con SII-D de SII-E. En niveles de triptasa en suero pueden combinarse con otros biomarcadores de SII para mejorar la exactitud de diagnosticar SII.

La figura 8 muestra las respuestas dependientes de la dosis de triptasa humana en el ELISA de triptasa descrito en el presente documento. Protocolo: Una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubrió con 100  $\mu$ l de 2 mg/ml de anticuerpo anti-triptasa humana en carbonato sódico (pH 9,6) a 4 °C durante la noche. Después de lavar con PBST, la placa se incubó con 300  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo/ensayo (5 % de BSA en PBS) a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos con agitación suave. Después de lavar, 100  $\mu$ l/pocillo de triptasa humana diluida en serie (1:8 en tampón de ensayo) se añadieron a la placa. Después de incubar a TA durante otras 2 horas, la placa se lavó y luego se incubó con 100  $\mu$ l de anti-triptasa humana conjugada con FA a una dilución optimizada en tampón de ensayo. La placa se incubó durante 2 horas con agitación suave y luego se lavó. Se añadieron 100  $\mu$ l de sustrato CSPD Tropix a cada pocillo y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos antes de leer la luminiscencia con un lector de placas de luminiscencia. La unidad relativa luminiscente (URL) y la concentración de triptasa se representaron con el programa Prism Graphpad. Intervalo de detección de triptasa = 0,019-5000 ng/ml.  $CE_{50} = 65$  ng/ml. La recuperación fue del 81,5 % con 20 ng enriquecidos en suero reunido normal.

La figura 9 muestra la optimización del ELISA de triptasa descrito en el presente documento. La figura 10 muestra niveles de triptasa en suero de controles sanos (n=139) y de sujetos con SII (n=378). Los niveles de triptasa se midieron por ELISA en muestras de suero diluidas 10 veces con tampón de ensayo. Los pacientes con SII también se muestran según su subtipo: SII-D (n=206): diarrea predominante; SII-E (n=116): estreñimiento predominante;

SII-A (n=56): síntomas alternos. Cada valor es el promedio de determinaciones duplicadas. Las líneas continuas son la mediana del valor de cada grupo. El valor de corte de 12 ng/ml se calculó a partir de sujetos sanos con mediana más 2 DE (línea de puntos). \*p<0.0001 frente a sujetos sanos; \*\*p<0.0001 frente a SII-D; prueba de la U de Mann Whitney. La Tabla 2 proporciona un resumen de niveles de triptasa en subtipos de SII y sujetos sanos (corte = 12,0 ng/ml).

Tabla 2. Niveles de triptasa (ng/ml) en subtipos de SII y sujetos sanos (corte = 12,0 ng/ml).

	Control sano	SII	SII-D	SII-E	SII-A
Sujetos (n)	139	381	209	116	56
Media (ng/ml)	7,1	10,3	10,3	9,6	12,1
DESV EST	2,4	9,2	8,7	9,4	10,7
Positivos	9	82	44	22	16

La figura 11 muestra el elevado nivel en suero de histamina y PGE<sub>2</sub> en pacientes con SII frente a controles sanos. La PGE<sub>2</sub> se midió en 50 µl de suero por ELISA usando un kit de Cayman. La histamina se midió en 10 µl de suero usando un kit de EIA de Immunotech. Las muestras se probaron por duplicado. La línea continua es la mediana de cada grupo. Como tal, en ciertos aspectos, SII-D puede diagnosticarse o distinguirse de otros subtipos clínicos de SII detectando un mayor nivel de PGE<sub>2</sub> con respecto a control sano, muestras de SII-A y/o SII-E o patrones. En ciertos otros aspectos, SII-D o SII-A puede diagnosticarse o distinguirse de SII-E detectando un mayor nivel de histamina con respecto a control sano y/o muestras de SII-E o patrones.

Conclusiones: (1) Se desarrolló un procedimiento de ELISA de sándwich que puede medir el nivel de triptasa en suero con alta sensibilidad, exactitud y precisión. El ensayo tiene un alto grado de reproducibilidad y es adecuado para la prueba rutinaria de un gran número de sueros humanos. (2) Usando este ELISA, los presentes inventores encontraron diferencias significativas en los niveles de triptasa en suero entre controles sanos y pacientes con SII. Entre los pacientes con SII, los pacientes SII-D y SII-A tuvieron niveles de triptasa estadísticamente mayores en comparación con pacientes con SII-E. (3) También se encontró que marcadores de mastocitos adicionales, histamina y PGE<sub>2</sub> eran anómalos en muestras de suero de pacientes con SII. Combinando estos marcadores con triptasa produjo exactitud del diagnóstico mejorada de SII.

### C. Ejemplo 3. Cuestionario para identificar la presencia o gravedad de síntomas asociados a SII

Este ejemplo ilustra un cuestionario que es útil para identificar la presencia o gravedad de uno o más síntomas relacionados con SII en un individuo. El cuestionario puede completarse por el individuo en la clínica o consulta del médico, o puede llevarse a casa y entregarse cuando el individuo vuelva a la clínica o consulta del médico, por ejemplo, para extraerse sangre.

En algunas realizaciones, el cuestionario comprende una primera sección que contiene un conjunto de preguntas que preguntan al individuo que dé respuestas en relación con la presencia o gravedad de uno o más síntomas asociados a SII. El cuestionario generalmente incluye preguntas dirigidas a identificar la presencia, gravedad, frecuencia y/o duración de síntomas relacionados con SII tales como dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón y/o distensión abdominal.

En ciertos casos, la primera sección del cuestionario incluye todas o un subconjunto de las preguntas de un cuestionario desarrollado por la Cámara de la Fundación de Roma basado en los criterios de Roma II, disponible en <http://www.romecriteria.org/questionnaires/>. Por ejemplo, el cuestionario puede incluir todas o un subconjunto de las 93 preguntas planteadas en las páginas 920-936 del Cuestionario de Diagnóstico de Roma III para Trastornos GI Funcionales del Adulto (Apéndice C), disponible en <http://www.romecriteria.org/pdfs/AdultFunctGIQ.pdf>. Preferentemente, la primera sección del cuestionario contiene 16 de las 93 preguntas planteadas en el Cuestionario de Diagnóstico de Roma III (véase la Tabla 3). Alternativamente, la primera sección del cuestionario puede contener un subconjunto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15) de las 16 preguntas mostradas en la Tabla 3. Como ejemplo no limitante, las 10 siguientes preguntas planteadas en la Tabla 3 pueden incluirse en el cuestionario: N° de preguntas 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15 y 16. Un experto en la materia apreciará que la primera sección del cuestionario puede comprender preguntas similares a las preguntas mostradas en la Tabla 3 en relación con dolor, molestia y/o cambios en la consistencia de las heces.

Tabla 3. Primera sección a modo de ejemplo de un cuestionario para identificar la presencia o gravedad de síntomas relacionados con SII.

1. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo dolor o molestia en medio del pecho (no relacionado con problemas del corazón)?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
2. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo ardor de estómago (una molestia de ardor o quemazón en el pecho)?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
3. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia se sintió incómodamente lleno después de una comida de tamaño normal?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca →</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
4. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia fue incapaz de terminar una comida de tamaño normal?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca →</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
5. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo dolor o ardor en el medio del abdomen, por encima del ombligo pero no en el pecho?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca →</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
6. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo molestia o dolor en cualquier parte del abdomen?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca →</li> <li>② Menos de un día al mes</li> <li>③ Un día al mes</li> <li>④ Dos a tres días al mes</li> <li>⑤ Un día a la semana</li> <li>⑥ Más de un día a la semana</li> <li>⑦ Todos los días</li> </ul>
7. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo menos de tres deposiciones (0-2) a la semana?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca o raramente</li> <li>② Algunas veces</li> <li>③ Frecuentemente</li> <li>④ La mayoría de las veces</li> <li>⑤ Siempre</li> </ul>
8. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo heces duras o grumosas?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca o raramente</li> <li>② Algunas veces (25 % de las veces)</li> <li>③ Frecuentemente (50 % de las veces)</li> <li>④ La mayoría de las veces (75 % de las veces)</li> <li>⑤ Siempre</li> </ul>
9. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia hizo esfuerzos durante la defecación?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca o raramente</li> <li>② Algunas veces</li> <li>③ Frecuentemente</li> <li>④ La mayoría de las veces</li> <li>⑤ Siempre</li> </ul>
10. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo una sensación de vaciamiento incompleto después de defecar?	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Nunca o raramente</li> <li>② Algunas veces</li> <li>③ Frecuentemente</li> </ul>



	③ La mayoría de las veces ④ Siempre
11. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo una sensación de que las heces no podían pasar (es decir, bloqueadas), cuando estaba defecando?	① Nunca o raramente ② Algunas veces ③ Frecuentemente ④ La mayoría de las veces ⑤ Siempre
12. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia presionó sobre o alrededor de las nalgas o retiró heces con el fin de completar una defecación?	① Nunca o raramente ② Algunas veces ③ Frecuentemente ④ La mayoría de las veces ⑤ Siempre
13. ¿Cualquiera de los síntomas de estreñimiento enumerados en las preguntas 27-32 anteriores empezaron hace más de 6 meses?	① No ② Sí
14. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo heces sueltas, blandas o líquidas?	① Nunca o raramente → ② Algunas veces (25 % de las veces) ③ Frecuentemente (50 % de las veces) ④ La mayoría de las veces (75 % de las veces) ⑤ Siempre
15. En los 3 últimos meses, ¿con qué frecuencia tuvo hinchazón o distensión?	① Nunca → ② Menos de un día al mes ③ Un día al mes ④ Dos a tres días al mes ⑤ Un día a la semana ⑥ Más de un día a la semana ⑦ Todos los días
16. ¿Sus síntomas de hinchazón o distensión empezaron hace más de 6 meses?	① No ② Sí

En otras realizaciones, el cuestionario comprende una segunda sección que contiene un conjunto de preguntas que preguntan al individuo que dé respuestas en relación con la presencia o gravedad de pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia relacionada con SII. Por ejemplo, el cuestionario puede incluir preguntas dirigidas a identificar la presencia, gravedad, frecuencia y/o duración de ansiedad, miedo, nerviosismo, preocupación, aprehensión, ansiedad, estrés, depresión, desesperanza, desesperación, pesimismo, duda y/o negatividad cuando el individuo está experimentando dolor o molestia asociado a uno o más síntomas del SII.

En ciertos casos, la segunda sección del cuestionario incluye todas o un subconjunto de las preguntas de un cuestionario descrito en Sullivan et ál., The Pain Catastrophizing Scale: Development and Validation, Psychol. Assess., 7:524-532 (1995). Por ejemplo, el cuestionario puede incluir un conjunto de preguntas para ser respondidas por un individuo según una Escala de Catastrofización ante el Dolor (PCS), que indica el grado al que el individuo tiene ciertos pensamientos y sentimientos negativos cuando experimenta dolor: 0 = en absoluto; 1 = a un ligero grado; 2 = a un grado moderado; 3 = a un gran grado; 4 = todo el tiempo. La segunda sección del cuestionario puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más preguntas o declaraciones relacionadas con identificar la presencia o gravedad de pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia relacionada con SII. Como ejemplo no limitante, a un individuo puede preguntársele que califique el grado al que tiene uno o más de los siguientes pensamientos y sentimientos cuando experimenta dolor: "Estoy preocupado todo el tiempo sobre si el dolor terminará o no"; "Siento que no puedo soportarlo más"; "Tengo miedo de que el dolor empeore"; "Quiero ansiosamente que el dolor desaparezca"; y "Sigo pensando cuándo duele". Un experto en la materia entenderá que el cuestionario puede comprender preguntas similares en relación con pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia relacionada con SII.

En algunas realizaciones, el cuestionario incluye solo preguntas de la primera sección del cuestionario o un subconjunto de la misma (véase, por ejemplo, la Tabla 3). En otras realizaciones, el cuestionario incluye solo preguntas de la segunda sección del cuestionario o un subconjunto de la misma.

Tras completarse el cuestionario por el individuo, los números correspondientes a las respuestas a cada cuestión pueden sumarse y el valor resultante puede combinarse con el análisis de uno o más marcadores de diagnóstico en una muestra del individuo y procesarse usando los algoritmos estadísticos descritos en el presente documento para aumentar la exactitud de predecir SII.

Alternativamente, una respuesta "Sí" o "No" del individuo a la siguiente cuestión: "¿Está actualmente sintiendo algún síntoma?" puede combinarse con el análisis de uno o más de los biomarcadores descritos en el presente documento y procesarse usando un único algoritmo estadístico o una combinación de algoritmos estadísticos para aumentar la

exactitud de predecir SII.

D. Ejemplo 4. Ensayo de diagnóstico basado en sangre para el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII)

5 El presente ejemplo describe la primera prueba de biomarcador basado en sangre para síndrome del intestino irritable (SII). Esta prueba puede ayudar a los profesionales clínicos en el diagnóstico del SII. El diagnóstico del SII descrito más adelante se validó usando muestras de SII bien caracterizadas recogidas de expertos en SII reconocidos y clínicas GI. Las muestras fueron tanto positivas para Roma II como Roma III y los pacientes tuvieron un diagnóstico de SII durante más de un año. La prueba tiene una sensibilidad del 50 %, especificidad del 88 % con  
10 una exactitud global del 70 %.

La cohorte total usada para desarrollar el presente ensayo consistió en 1.721 muestras de suero. La cohorte de validación usada consistió en 516 muestras de suero, de las que el 50 % se diagnosticaron con SII según los criterios de Roma II o Roma III; el 36 % fueron controles de no enfermedad de SII; y el 14 % fueron controles normales sanos. La sensibilidad del ensayo es del 50 % y la especificidad es del 88 %. Cuando se confirma SII, en el que el médico ha determinado que hay aproximadamente un 75 % de probabilidad de enfermedad en el paciente, el 94 % de los resultados de pruebas positivas son positivos verdaderos, mientras que el 38 % de los resultados de pruebas negativas son negativos verdaderos. Si se descarta SII, en el que el médico ha determinado que hay aproximadamente un 25 % de probabilidad de enfermedad en el paciente, el 86 % de los resultados de pruebas negativas son negativos verdaderos, mientras que el 61 % de los resultados de pruebas positivas son positivos verdaderos.

El ensayo implica el análisis cuantitativo de biomarcadores combinados con un sistema de aprendizaje de dos clasificadores estadísticos que consiste en un clasificador de bosques aleatorios y un clasificador de redes neuronales.

Los requisitos del espécimen para el ensayo consisten en que el médico obtiene 2,0 ml de suero separado en, por ejemplo, un tubo de SST. Para mejores resultados, la muestra debe ser centrifugada y refrigerada en el plazo de 2 horas desde la recogida. Si las muestras necesitan ser transportadas antes del ensayo de detección, las muestras deben refrigerarse o congelarse. Para mejores resultados, las muestras deben guardarse, antes de uso, durante no más de 7 días a 4 °C o 30 días si se congelan.

Brevemente, se realizan enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) con anticuerpos específicos para los biomarcadores de SII ASCA-IgA, CBir1, ANCA y tTG. Adicionalmente, se realizan ensayos quimioluminiscentes para los biomarcadores de SII BDNF, NGAL, TWEAK, GRO- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TIMP-1. Valores de referencia para el intervalo normal de estos marcadores en sujetos sanos se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de referencia para los marcadores detectados en el ensayo de SII.

Marcador	Nivel de referencia
BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro)	7536,5 - 31324,4 pg/ml
NGAL (lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos)	28,3 - 272,5 ng/ml
TWEAK (inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF)	351,6 - 1751,7 $\mu$ g/ml
GRO- $\alpha$ (oncogén alfa regulado por el crecimiento)	26,4 - 499,3 pg/ml
IL-1 $\beta$ (interleucina-1 beta)	279,5 - 1358,6 fg/ml
TIMP-1 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1)	156,1 - 410,6 ng/ml
ASCA-IgA (anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae)	< 20,0 UE/ml
CBir1 (anticuerpo anti-CBir1)	< 21,0 UE/ml
ANCA (anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos)	< 12,1 UE/ml
tTG (IgA anti-transglutaminasa tisular humana)	< 4,0 U/ml

40 En ciertos casos, la información de la detección de los biomarcadores de SII descritos anteriormente puede combinarse con la información de síntomas proporcionada por el paciente. Por ejemplo, el paciente puede rellenar una lista de verificación de sus síntomas, cuya información puede combinarse con la información de los biomarcadores de SII para ayudar adicionalmente al profesional clínico en el diagnóstico de SII. Un ejemplo de una  
45 lista de verificación que puede usarse en este modo se proporciona en la Tabla 5.

Tabla 5. Lista de verificación del paciente de ejemplo de síntomas comúnmente asociados a SII.

Lista de verificación de síntomas de SII
Rellenar y llevar a la siguiente cita.
Nombre
Fecha de la cita
Ponga una marca de verificación próxima a cualquier síntoma que tenga actualmente o que haya tenido en el pasado. Nota ¿con qué frecuencia están presentes estos síntomas?.
_____ Dolor abdominal o molestia recurrente
_____ Frecuencia anormal de las deposiciones (superior a 3 defecaciones/día o inferior a 3 defecaciones/semana)
_____ Forma anormal de las heces (heces grumosas/duras o sueltas/líquidas)
_____ Paso anormal de las heces (esfuerzo, necesidad imperiosa o sensación de defecación incompleta)
_____ Paso de moco
_____ Meteorismo o sensación de distensión abdominal
_____ Gases
_____ Sensación de necesidad imperiosa (la necesidad de encontrar rápidamente un servicio)

E. Referencias:

- 5
1. Barbara G y Cremon C. Serine proteases: new players in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Gut. 2008 May;57(5):591-9.
  2. Barbara G, Wang B, Stanghellini V et ál. Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology 2007;132:26-37.
- 10

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de ayuda en el diagnóstico del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) poner en contacto una muestra de sangre o de suero del sujeto con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa; y
- (b) determinar el nivel de dicho complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además:

- (c) comparar el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con un nivel de control, en el que el nivel de control es el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto sano, en el que un elevado nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativo de una elevada probabilidad de que dicho sujeto tenga SII, y/o en el que el mismo nivel o un nivel reducido de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativo de una elevada probabilidad de que dicho sujeto no tenga SII.

3.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además:

- (c) comparar el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con un nivel de control, en el que el nivel de control es el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en una muestra de sangre o de suero de un sujeto con SII, en el que el mismo nivel o un nivel elevado de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativo de una elevada probabilidad de que dicho sujeto tenga SII, y/o en el que un nivel reducido de  $\beta$ -triptasa presente en la muestra con respecto al nivel de control es indicativo de una elevada probabilidad de que dicho sujeto no tenga SII.

4.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende además determinar el nivel de histamina y/o prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en la muestra.

5.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se sospecha que el sujeto tiene SII.

6.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el resto de unión comprende un anticuerpo, en el que el procedimiento es preferentemente un ensayo de inmunoadsorción (ELISA), más preferentemente un ELISA de sándwich, en el que el ELISA de sándwich comprende opcionalmente el uso de un anticuerpo anti-triptasa conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo de detección y un sustrato luminiscente que contiene CPSD para potenciar la sensibilidad del ensayo.

7.- Un procedimiento de monitorización de la progresión o regresión del síndrome del intestino irritable (SII) en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) poner en contacto una primera muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un primer momento con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa;
- (b) determinar el nivel de dicho complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la primera muestra;
- (c) poner en contacto una segunda muestra de sangre o de suero tomada del sujeto en un segundo momento con un resto de unión a  $\beta$ -triptasa en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el resto de unión a  $\beta$ -triptasa;
- (d) determinar el nivel de dicho complejo, determinando así el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la segunda muestra; y
- (e) comparar el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la primera muestra con el nivel de  $\beta$ -triptasa presente en la segunda muestra, en el que un mayor nivel de  $\beta$ -triptasa en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la progresión de SII en el sujeto y un menor nivel de  $\beta$ -triptasa en la segunda muestra con respecto a la primera muestra es indicativo de la regresión de SII en el sujeto, en el que el procedimiento comprende opcionalmente además determinar el nivel de histamina y/o prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) presente en las muestras.

8.- El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende monitorizar la eficacia del fármaco en un sujeto que recibe un fármaco útil para tratar síndrome del intestino irritable (SII).

9.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende además determinar el nivel de al menos un biomarcador adicional en una muestra biológica del sujeto, el

- 5 biomarcador seleccionado del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), oncogén alfa relacionado con el crecimiento (GRO-a), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP-1), anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae (AS CA-IgA), anticuerpo anti-CBir-1 (CBir1), anticuerpo anti-neutrófilos citoplásmicos humanos (ANCA), IgA anti-transglutaminasa tisular humana (tTG), y una combinación de los mismos, en el que dicha muestra biológica está seleccionada preferentemente del grupo que consiste en suero, plasma, sangre completa y heces.
- 10 10.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende además determinar un perfil de síntomas para el sujeto, en el que dicho perfil de síntomas se determina identificando la presencia o gravedad de al menos un síntoma en dicho sujeto, en el que dicho al menos un síntoma está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en dolor torácico, molestias torácicas, ardor de estómago, saciedad molesta después de haber tenido una comida de tamaño normal, incapacidad para terminar una comida de tamaño normal, dolor abdominal, molestia abdominal, estreñimiento, diarrea, hinchazón, distensión abdominal,
- 15 15 pensamientos o sentimientos negativos asociados a tener dolor o molestia, y una combinación de los mismos, en el que el procedimiento comprende preferentemente el uso de un algoritmo basado en el nivel de un biomarcador de SII, en el que el algoritmo se basa preferentemente adicionalmente en el perfil de síntomas, en el que dicho algoritmo comprende preferentemente un algoritmo estadístico, en el que dicho algoritmo estadístico comprende preferentemente un sistema de aprendizaje de clasificadores estadísticos o una combinación de al menos dos
- 20 20 sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos, en el que la combinación de al menos dos sistemas de aprendizaje de clasificadores estadísticos comprende preferentemente un clasificador de bosques aleatorios y un clasificador de redes neuronales.
- 25 11.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende proporcionar una probabilidad de que el sujeto tiene SII.
- 30 12.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende además clasificar un diagnóstico de SII como SII-estreñimiento (SII-E), SII-diarrea (SII-D), SII-mixto (SII-M), SII-alterno (SII-A) o SII post-infeccioso (SII-PI).
- 35 13.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento comprende además diagnosticar el sujeto que no tiene SII como que tiene EII, como que no tiene EII, o como que es un sujeto sano.
- 40 14.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende
- 45 (a) recubrir una superficie en fase sólida con un primer anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa;  
 (b) poner en contacto la superficie en fase sólida con una muestra de sangre o de suero en condiciones adecuadas para transformar la  $\beta$ -triptasa presente en la muestra en un complejo que comprende  $\beta$ -triptasa y el anticuerpo de captura anti- $\beta$ -triptasa;  
 (c) poner en contacto la  $\beta$ -triptasa y el complejo de anti- $\beta$ -triptasa con un segundo anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina en condiciones adecuadas para formar un complejo ternario; y  
 (d) poner en contacto el complejo ternario con un sustrato luminiscente de CPSD, en el que el límite de detección de  $\beta$ -triptasa en la muestra de sangre o de suero es preferentemente inferior a aproximadamente 100 pg/ml, más preferentemente inferior a aproximadamente 25 pg/ml

# Optimizar el Ac de recubrimiento

Curva de respuesta a la dosis de triptasa humana con diferente cantidad de anticuerpo de recubrimiento

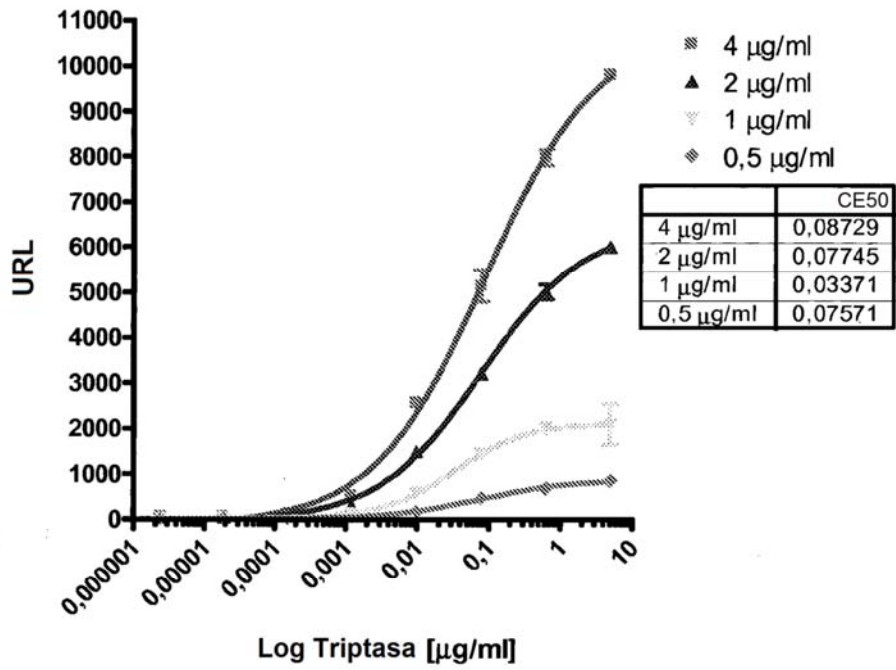


FIG. 1

# Optimizar el Ac de detección

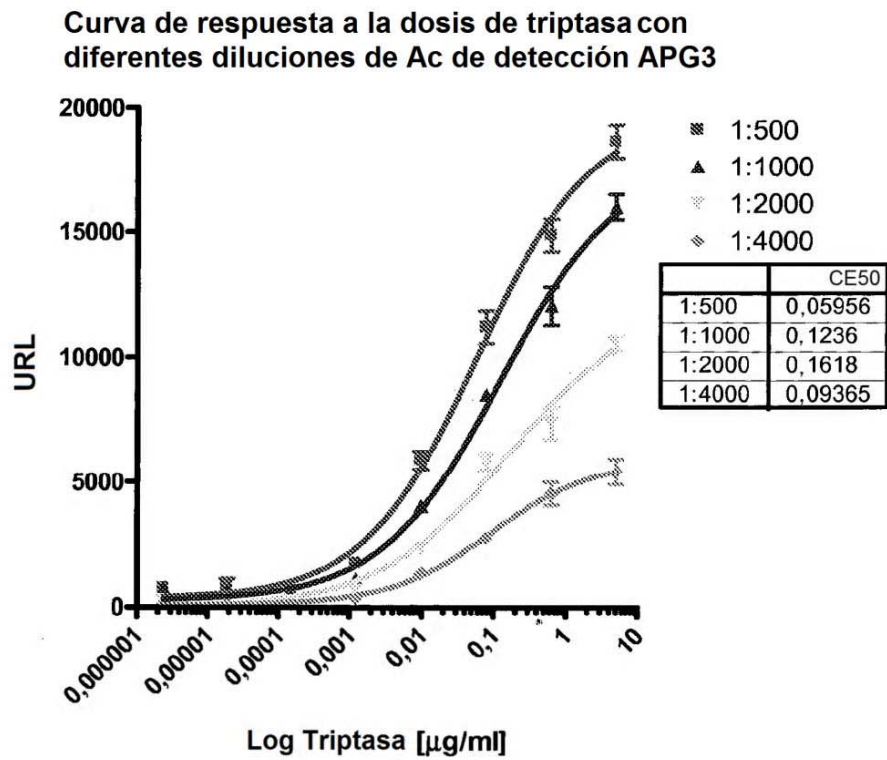
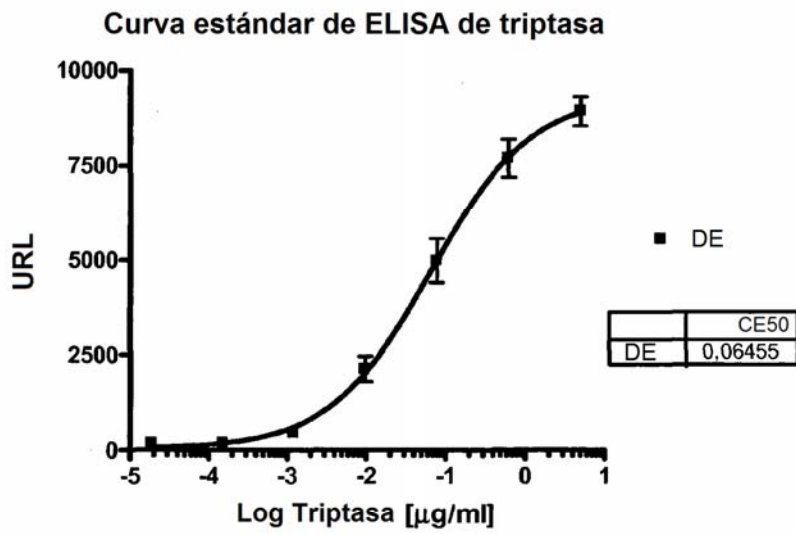


FIG. 2

**Desarrollo de ELISA de triptasa humana sensible para la  
detección de triptasa en suero humano**



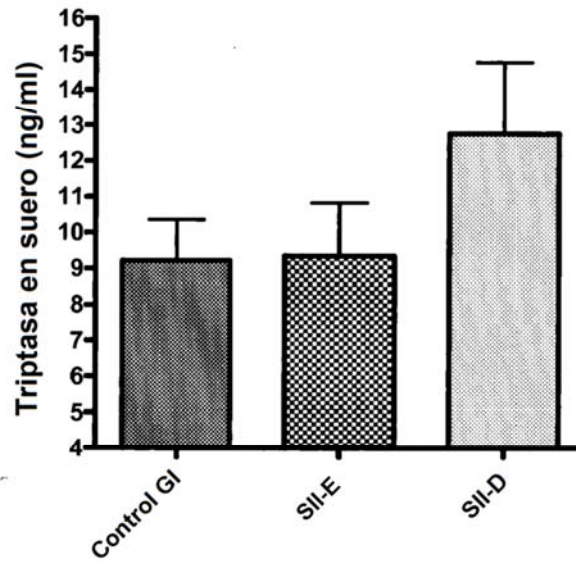
**FIG. 3**



**Concentración de triptasa humana en suero de pacientes de control GI (71), con SII-E (61) y SII-D (203).**

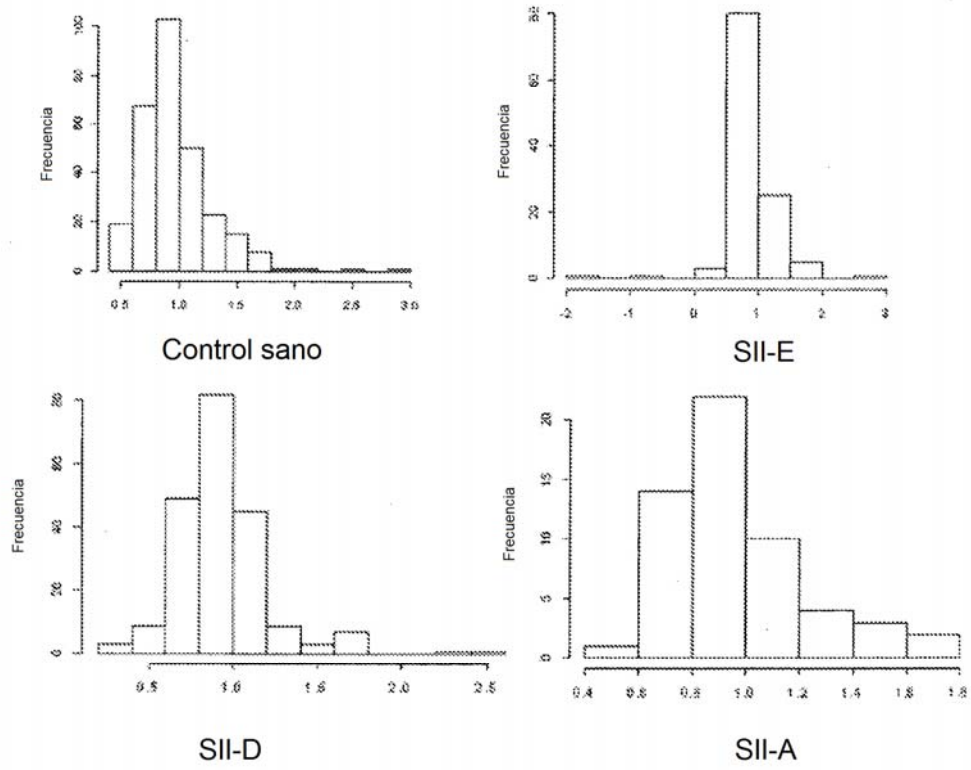
Los valores se expresan como media (EEM).

\*p = 0,0019 para SII-D; prueba de la U de Mann Whitney



**FIG. 4**

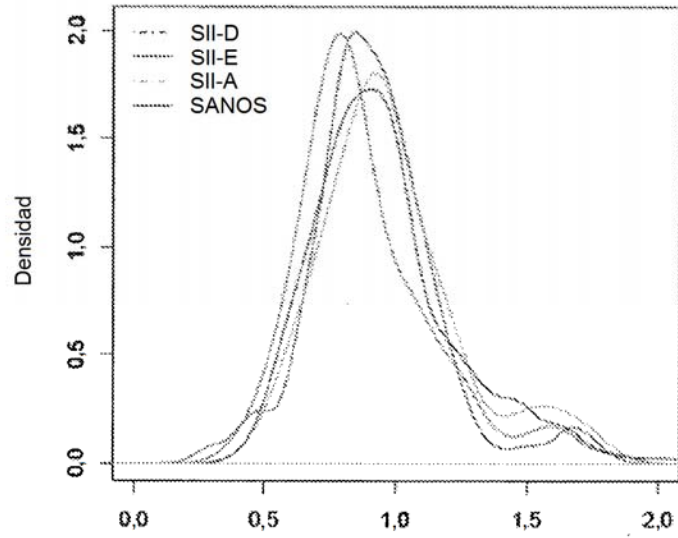
# Distribución del valor logarítmico de triptasa



**FIG. 5**

# Análisis de densidad para datos de triptasa

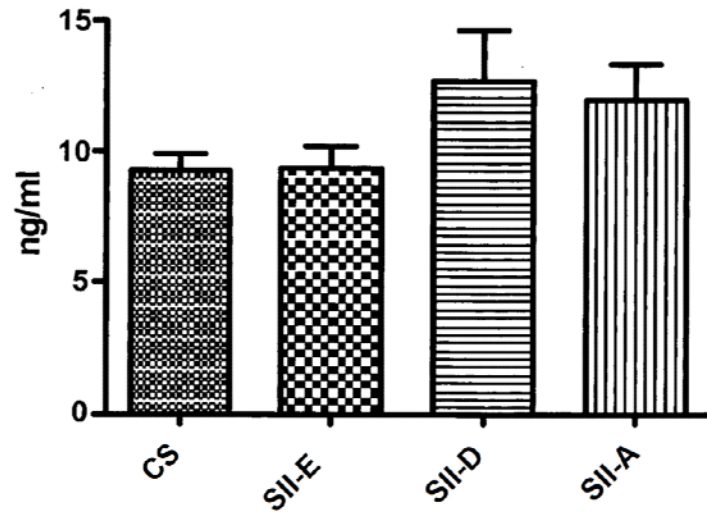
Cohortes 06IBS03



**FIG. 6**

**Concentración de triptasa humana en suero de control sano (n=156), SII-D (n=209), SII-E (n=119) y SII-A (n=57)**

Los valores se expresan como media (EEM),  $p < 0,05$  para SII-D; prueba de la U de Mann Whitney



**FIG. 7**

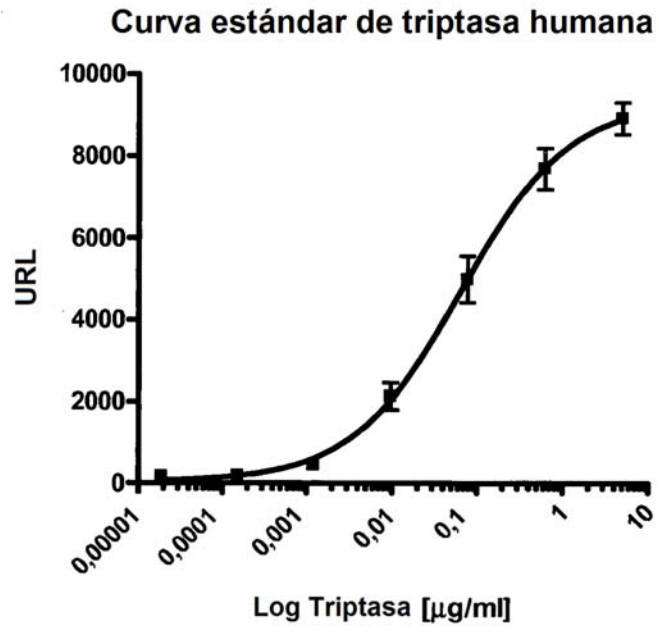


FIG. 8

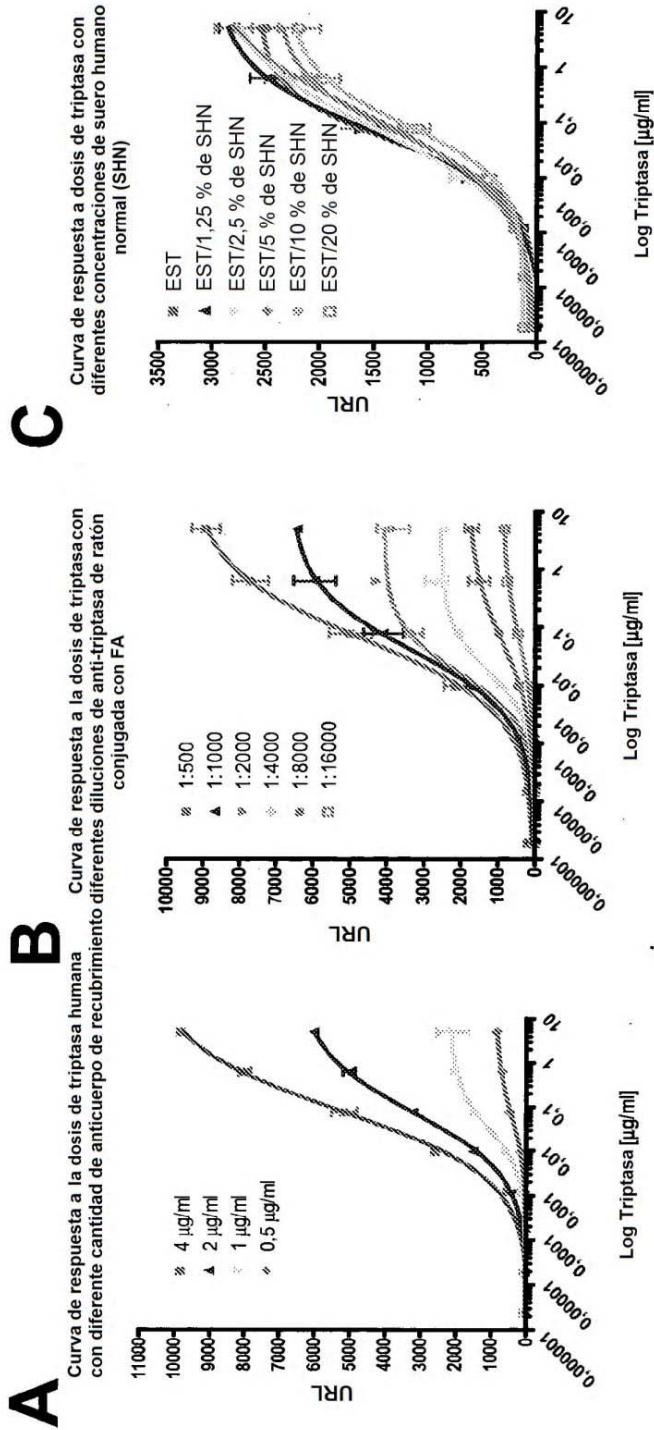


FIG. 9

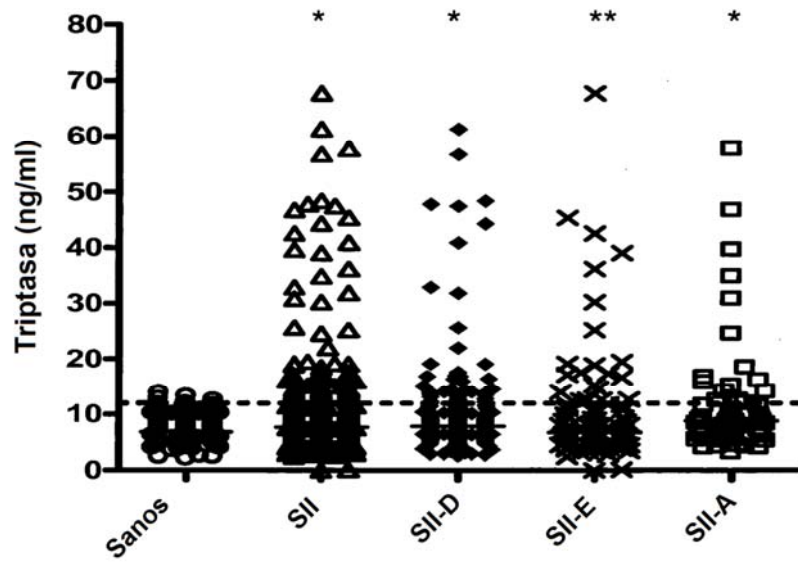
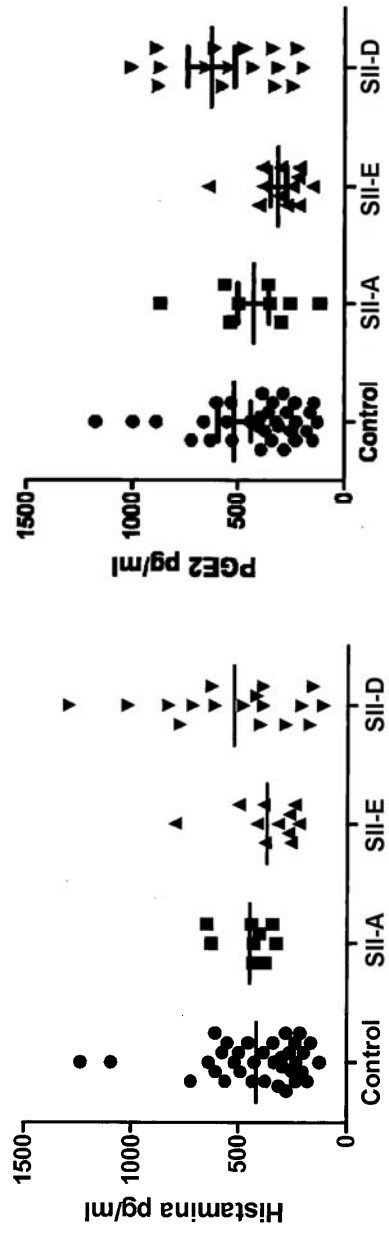


FIG. 10



Marcadores	CS N=35	SII-A N=9	SII-E N=12	SII-D N=17
PGE2 pg/ml	370,4	256,0	282,4	542
Histamina pg/ml	338,3	429,3	318,3	418,2

FIG. 11



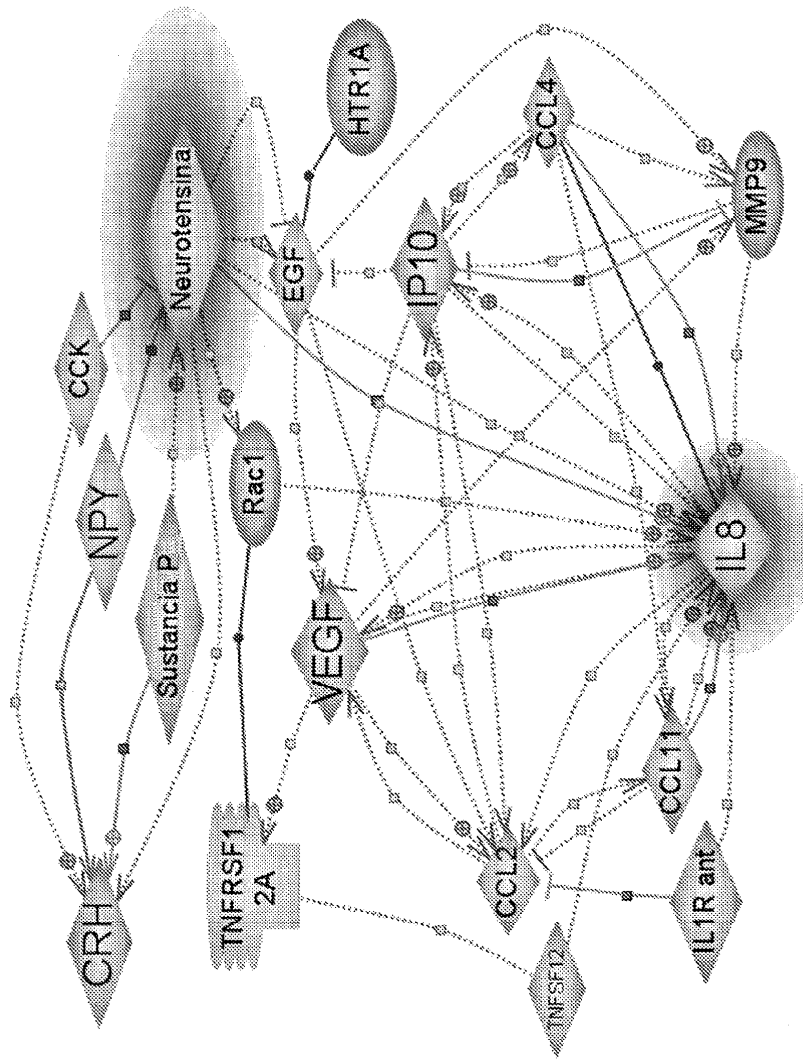


FIG. 12

SCE  
200

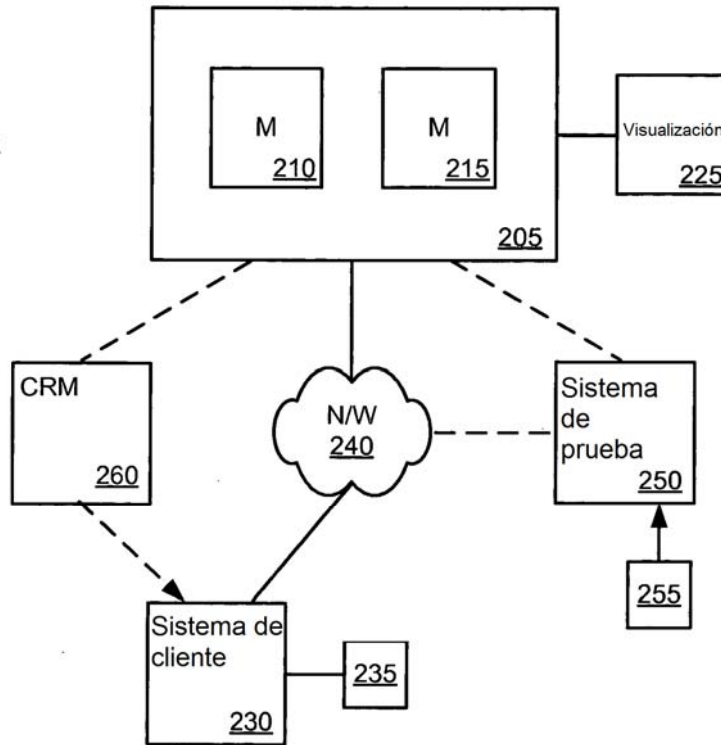


FIG. 13