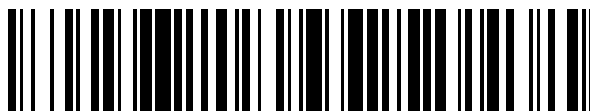


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 954**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2009 E 09795888 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2382466**

54 Título: **Método de predicción de apendicitis aguda**

30 Prioridad:

30.12.2008 US 141283 P
10.06.2009 US 185676 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2016

73 Titular/es:

CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)
55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US

72 Inventor/es:

KENTSI, ALEX;
STEEN, HANNO y
BACHUR, RICHARD

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 573 954 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

Método de predicción de apendicitis aguda

Antecedentes

5 La apendicitis es una afección caracterizada por la inflamación del apéndice. Todos los casos requieren la extirpación del apéndice inflamado, ya sea por laparotomía o laparoscopia. Sin tratamiento, la mortalidad es alta, principalmente a causa de la peritonitis y shock.

10 La apendicitis es una de las muchas enfermedades humanas, para las que el diagnóstico se complica por la heterogeneidad de su presentación clínica. Los pacientes con muchos otros trastornos se pueden presentar con síntomas similares a los de la apendicitis. Ejemplos incluyen los siguientes: enfermedad pélvica inflamatoria (PID) o absceso tubo-ovárico, endometriosis, quistes ováricos o torsión, ureterolitiasis y cólico renal, degeneración de los leiomiomas uterinos, diverticulitis, enfermedad de Crohn, carcinoma de colon, hematoma de la vaina del músculo recto, colecistitis, enteritis bacteriana, adenitis mesentérica, y torsión de epiplón. Se mantiene la emergencia quirúrgica más común de los niños, con una precisión del diagnóstico inicial, además, se desafía a causa de los síntomas no específicos, pero similares de muchas otras condiciones de la infancia. Los retrasos en el diagnóstico preciso conducen a un aumento de la mortalidad, la morbilidad y los costes asociados con las complicaciones de la apendicitis.

15 El uso de la tomografía computarizada de alta resolución (CT) para identificar la inflamación apendicular se espera que mejore tanto el diagnóstico como el tratamiento de la apendicitis aguda. Aunque variables, estas mejoras han sido modestos en el mejor de los casos, con tasas de apendicectomías innecesarias y rupturas de 3–30% y 30–45%, respectivamente. Además, la disponibilidad y experiencia con CT limitan la utilidad de este enfoque. Además, recientemente su uso se ha reevaluado debido a las preocupaciones de riesgo de cáncer.

20 La WO2006/125973 proporciona un método de diagnóstico de la tuberculosis (TB) en un sujeto de ensayo, proporcionando los datos de expresión de dos o más marcadores en un sujeto, en donde uno de los marcadores es alfa-2-glucoproteína rica en leucina (A2GL).

La WO2006/125973 no sugiere el diagnóstico de apendicitis con alfa-2-glucoproteína rica en leucina (A2GL).

25 Sack U. et al. (Vol. 6, no. 1, 28 November 2006 (2006–11–28), páginas 15–22) describe el valor de diagnóstico de los marcadores inflamatorios en la sangre para la detección de la apendicitis aguda en niños, pero no revela la leucina α -2-glucoproteína como marcador para la apendicitis.

Por lo tanto, se necesita y es deseable el desarrollo de diagnósticos no invasivos.

Resumen de la invención

30 La presente invención generalmente se refiere a dispositivos, usos y métodos para determinar la apendicitis aguda en un sujeto, tal como un sujeto humano. En particular, los inventores han descubierto un conjunto de biomarcadores de apendicitis que están presentes en una muestra de orina obtenida de un sujeto con apendicitis aguda. Como tal, un aspecto de la presente invención proporciona dispositivos, usos y métodos para detectar la presencia de dichos biomarcadores de apendicitis en una simple orina de un sujeto, tal como un sujeto humano. En algunas realizaciones, el dispositivo está en el formato de un ensayo de varilla indicadora, en particular, un inmunoensayo de flujo lateral.

35 El biomarcador de apendicitis es la leucina α 2-glucoproteína (LRG). En algunas realizaciones, un biomarcador de apendicitis adicional se puede seleccionar de los grupos seleccionados entre S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); y α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).

40 Un aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de un dispositivo que comprende: (a) un agente de unión de proteína que se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis que comprende leucina α -2 glucoproteína (LRG); y (b) al menos un soporte sólido para el agente de unión de proteína en (a), en donde el agente de unión de proteína se deposita sobre el soporte sólido; para identificar un sujeto que tiene apendicitis aguda, en donde si el biomarcador de apendicitis que comprende leucina α -2 glucoproteína (LRG) se une específicamente al agente de unión de proteína, es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda. En algunas realizaciones, un agente de unión de proteína depositado sobre el soporte sólido se une específicamente con la leucina α -2 glucoproteína (LRG) de la SEQ ID NO: 1.

45 En algunas realizaciones, el dispositivo es útil para detectar múltiples biomarcadores de apendicitis, por ejemplo, cuando el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína adicional diferente depositado sobre

el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora seleccionada del grupo que consiste en: S100-A8 (calgranulina); α -1 glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); y α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).

5 En algunas realizaciones, el dispositivo es útil para detectar múltiples biomarcadores de apendicitis, por ejemplo, cuando el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína adicional diferente depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora seleccionada del grupo que consiste en: molécula de adhesión específica de adipocitos; AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de la inter-
10 α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción PDZK1 1; PRIC285; prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VA0D1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-
15 glucoproteína ácida 2; β -1,3-galactosiltransferasa, también se revelan en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el soporte sólido del dispositivo está en el formato de una varilla indicadora, un chip microfluídico o un cartucho. La varilla indicadora puede ser una tira de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral. Una tira de ensayo única se puede probar para un biomarcador de apendicitis, tal como LRG u ORM o S100-A8. Una tira de ensayo única puede probar diversos biomarcadores de apendicitis, por ejemplo, una sola prueba con la tira de ensayo
20 para los tres biomarcadores de apendicitis: LRG, ORM y S100-A8; o una sola prueba con las tiras de ensayo para los dos biomarcadores de apendicitis: LRG y ORM; LRG y S100-A8; u ORM y S100-A8

En algunas realizaciones, un agente de unión de proteína es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, molécula pequeña o variante o fragmento de los mismos. El sujeto puede ser un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano. El sujeto puede tener al menos un síntoma de apendicitis, como se revela en este documento.

25 Como se describe en este documento, un agente de unión de proteína depositado en el dispositivo se puede unir específicamente a la proteína biomarcadora de apendicitis específica cuando el nivel de la proteína biomarcadora de apendicitis es al menos 2 veces por encima de un nivel de referencia para esa proteína biomarcadora de apendicitis. Por lo general, un nivel de referencia para un biomarcador de apendicitis particular es un nivel medio de la proteína biomarcadora de apendicitis en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no
30 tienen apendicitis aguda.

También se describe en este documento un kit, donde el kit comprende (a) un dispositivo como se revela en este documento, y (b) un primer agente, en donde el primer agente produce una señal detectable en presencia de un agente de unión de proteína depositado en el dispositivo es específicamente unido a una proteína biomarcadora. Un kit comprende opcionalmente además un segundo agente, en donde el segundo agente produce una señal detectable
35 diferente en la presencia de un segundo agente de unión de proteína depositado en el dispositivo que está unido específicamente a una segunda proteína biomarcadora.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar la probabilidad de que un sujeto tenga apendicitis aguda que comprende: (a) medir el nivel de una primera proteína biomarcadora de apendicitis que comprende leucina α -2 glucoproteína (LRG) en una muestra de orina del sujeto humano; (b) comparar el nivel de la
40 primera proteína biomarcadora de apendicitis medida en la etapa (a) con un nivel de referencia para el biomarcador medido, en donde un nivel de biomarcador medido por encima del nivel de referencia para el biomarcador, indica que es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda. El método puede ser utilizado para guiar a un médico a dirigir una terapia apropiada a un sujeto que se identifica que tiene apendicitis aguda.

45 En algunas realizaciones, el método comprende además determinar el nivel de albúmina en la muestra de orina del sujeto humano. El sujeto puede ser un sujeto humano y el sujeto humano puede haber presentado al menos un síntoma de apendicitis aguda.

En algunas realizaciones, el método comprende la medición de un nivel de biomarcador de apendicitis mediante cualquier método conocido por un experto normal en el arte, tal como por ejemplo con el uso de un inmunoensayo o un inmunoensayo automatizado, o un ensayo de varilla indicadora, como se revela en este documento.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además medir el nivel de al menos un segundo biomarcador de apendicitis seleccionado de un grupo que consiste en molécula de adhesión específica de adipocitos; calgranulina A (S100-A8); α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); el zinc- α -2-glucoproteína (AZGPI); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3); apolipoproteína D (ApoD); AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD14;

5 cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de la inter- α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción 1 PDZK1; PRIC285; prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VA0D1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; y β -1,3-galactosiltransferasa.

10 En algunas realizaciones, el nivel de referencia en el método es un nivel del biomarcador de apendicitis particular, medido en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel medio del biomarcador de apendicitis en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel normalizado del biomarcador de apendicitis en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, en donde la normalización se lleva a cabo contra el nivel de albúmina en la muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda.

15 El método puede comprender medir el nivel del biomarcador de apendicitis en una muestra de orina recogida en medio de la corriente. El método puede comprender medir el nivel del biomarcador de apendicitis depositando la muestra de orina del sujeto en un dispositivo, tal como un dispositivo de tira de ensayo o varilla indicadora, como se revela en este documento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo para el diagnóstico de la probabilidad de apendicitis aguda que comprende:

20 a. un agente de unión de proteína que se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis comprende leucina α -2 glucoproteína (LRG); y

b. al menos un soporte sólido para el agente de unión de proteína en (a), en donde el agente de unión de proteína se deposita sobre el soporte sólido;

25 en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína diferente adicional depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo que consiste en: S100-A8 (calgranulina); α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 es una separación SDS-PAGE representativa de 17,000 g, 210,000 g, y las fracciones de TCA de tres muestras de orina (1, 2, 3) que demuestra pequeñas diferencias en la abundancia de proteína total entre las diferentes muestras de orina, y fraccionamiento preferencial de albúmina (●) y uromodulina (►) en la fracción de 17,000 g, lo que permite una mejor detección de las proteínas urinarias restantes. La mayoría de la albúmina y uromodulina parece sedimentar a 17,000 g, lo que demuestra que existen en complejos de alto peso molecular, en consonancia con la capacidad de uromodulina para polimerizar en la orina.

35 Las figuras 2A-2B muestran los espectros de masas representativos. La figura 2A es la intensidad de iones relativa como una función de los valores de m/z de iones precursores (MS), con el péptido doblemente cargado LDITAEILAVR de plunc marcada por la flecha, y la Fig 2B es el espectro de fragmentación con iones de fragmentos marcados como iones de fragmentos serie y- y b- (MS/MS).

40 Las figuras 3A-3B muestran el error de precisión en masa aparente del LTQ-Orbitrap. La figura 3A es un gráfico de probabilidad acumulada del error de precisión de masa, y la Fig 3B es el histograma del error de precisión de masa LTQ-Orbitrap, como se evaluó por comparación de masas observadas del péptido de autólisis de tripsina VATVSLPR, en comparación con su masa monoisotópica esperada, lo que indica que la mayoría de los péptidos tienen errores de masa aparente de menos de 2 ppm.

45 La Figura 4 es un diagrama de Venn que muestra las comparaciones del proteoma urinario agregado observado con los publicados por Adachi *et al* [13], y Pisitkun *et al* [10], lo que demuestra alta concordancia con los estudios anteriores de la orina humana, así como el descubrimiento de proteínas no observadas previamente.

50 La Figura 5 es un histograma que muestra la variabilidad en la composición de proteomas de orina individuales, de acuerdo con la evaluación de los coeficientes de variación de los recuentos espectrales de las proteínas, lo que demuestra una amplia distribución, incluyendo las proteínas que son relativamente invariante (A: albúmina, cubilin,

megalín), y los que parecen variar entre los proteomas individuales (B: α 1-anti-tripsina, fibrinógeno, α 2-macroglobulina).

5 La Figura 6 es un gráfico de dispersión que muestra el enriquecimiento relativo de proteínas biomarcadoras de apendicitis como una función de sobreexpresión de tejido de apendicitis de los genes correspondientes, lo que demuestra que más del 50% de los marcadores con una sobreexpresión de tejido muestran enriquecimiento de orina (\square), pero que sólo 3 de estos (\blacksquare) se identificaron como marcadores de perfiles de proteoma urinario.

La Figura 7 es un diagrama de flujo que muestra un esquema experimental, describiendo los métodos utilizados para la captura y fraccionamiento de proteínas, de la identificación y descubrimiento de biomarcadores de apendicitis utilizando la proteómica de orina, y la validación de biomarcadores de diagnóstico de apendicitis.

10 La figura 8 es un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa de proteínas en orina (unidades de corriente de iones de logaritmos normalizado) de los marcadores de diagnóstico validados para los grupos de pacientes sin apendicitis (abierto) y apendicitis (tramado). El valor normalizado de 1 corresponde a la abundancia aparente del estándar de referencia interna. Las cajas contienen el rango intercuartil 25–75%, con las barras de división que representan la media, los bigotes que representan el rango 10–90%, y las cruces que representan el rango 1–99%. Los
15 símbolos cuadrados representan las medianas. La abundancia de LRG en pacientes con pielonefritis (punto sólido, \bullet), y aquellos que se sometieron a apendicectomías con los hallazgos de apéndices histológicamente normal (punto vacío, \circ).

Las figuras 9A–9B muestran la validación de biomarcadores de apendicitis seleccionados. La figura 9A muestra las características de funcionamiento del receptor de proteínas biomarcadoras de apendicitis de la orina validado por espectrometría de masas dirigida, lo que demuestra el rendimiento de diagnóstico relativo de la α –2–glucoproteína rica en leucina (LRG), calgranulina A (S100–A8), α –1–glucoproteína ácida 1 (ORM), y la apolipoproteína D (ApoD). Fig 9B muestra el enriquecimiento de LRG en una muestra aleatoria de orina de los pacientes con diagnóstico histológico de apendicitis probada (+) en comparación con aquellos sin (–) mediante el uso de inmunotransferencia Western. Se observó señal LRG en 5/5 pacientes con apendicitis y no se observó señal en 5/6 pacientes sin apendicitis.

20 Las figuras 10A–10B muestran la validación clínica de biomarcadores de apendicitis seleccionados. La figura 10A es un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa proteína biomarcadora de apendicitis (unidades de corriente de iones normalizada) de α –2–glucoproteína rica en leucina (LRG) (panel superior) y calgranulina A (S100–A8) (panel inferior) como una función de la gravedad de la apendicitis, como se evaluó utilizando la clasificación histológica. Tener en cuenta que el grupo con apéndices histológicamente normal incluye tanto a los pacientes que se sometieron a apendicectomías y pacientes sin diagnóstico clínico de apendicitis. La figura 10B muestra micrografías representativas de muestras de apendicectomía y tinción inmunohistoquímica contra LRG, lo que demuestra en señal de LRG arrugado en muestras de apendicectomía con el grado más severo de apendicitis.

30 La figura 11A (vista superior) y 11B (vista lateral) muestra los diagramas esquemáticos de una tira de ensayo con varilla indicadora de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) a modo de ejemplo para la determinación de que el nivel de una proteína biomarcadora de apendicitis en orina es mayor que (o aumenta en comparación con) un nivel de referencia predeterminado.

La figura 12A–D son diagramas esquemáticos de las vistas superiores de las tiras de ensayo con varilla indicadora LFIA de ejemplo mostradas en la figura 11, que muestra los diferentes resultados que se obtuvieron utilizando la tira de ensayo simple mostrada en la figura 11.

40 La figura 13 muestra un diagrama esquemático de cómo los niveles de tres proteínas biomarcadoras se pueden determinar simultáneamente utilizando tres tiras de ensayo LFIA independientes, una tira de ensayo para una proteína biomarcadora diferente. Un kit de diagnóstico puede comprender varias tiras de ensayo LFIA, una tira para una proteína biomarcadora diferente.

45 La figura 14 muestra un diagrama esquemático de cómo se determinan simultáneamente los niveles de tres proteínas biomarcadoras en la misma tira de ensayo LFIA. Un kit de diagnóstico puede comprender una tira de ensayo LFIA multiplex o compuesto única para la determinación de los niveles de varias proteínas biomarcadoras simultáneamente. La tira de ensayo compuesta única tiene tres agentes de unión de proteínas distintos específicos, respectivamente, para tres proteínas biomarcadoras de apendicitis.

50 La figura 15A–D son diagramas esquemáticos de una realización alternativa de una tira de ensayo con varilla indicadora LFIA de ejemplo mostrada en la figura 11 para determinar si el nivel de una proteína biomarcadora en una muestra de fluido está por encima o por debajo de un valor de referencia/control para que biomarcador y la interpretación de los resultados obtenidos. Dos anticuerpos antibiomarcadores diferentes se utilizan en la tira de ensayo.

La figura 16A (vista superior) y 16B (vista lateral) muestra un diagrama esquemático de una realización alternativa de una tira de ensayo LFIA para determinar el nivel de una proteína biomarcadora en una muestra de fluido y comparar el nivel determinado con un valor de referencia. La definición S, T, C son como en la figura 11.

5 La figura 17A–F son diagramas esquemáticos que muestran los diferentes resultados que se pueden obtener utilizando la tira de ensayo LFIA mostrada en la figura 16.

La figura 18 muestra un diagrama esquemático de una versión alternativa de cómo los niveles de cuatro proteínas biomarcadoras se pueden determinar simultáneamente utilizando cuatro tiras de ensayo LFIA separadas, una tira de ensayo para una proteína biomarcadora diferente. Un kit de diagnóstico puede comprender múltiples tiras de ensayo LFIA, una tira para una proteína biomarcadora diferente.

10 La figura 19 muestra un diagrama esquemático de una versión alternativa de cómo los niveles de tres proteínas biomarcadoras se determinan simultáneamente en la misma tira de ensayo LFIA. Un kit de diagnóstico puede comprender una tira de ensayo LFIA compuesta única para determinar los niveles de varias proteínas biomarcadoras.

Descripción detallada de la invención

15 Las realizaciones de la presente invención se basan en el descubrimiento de ocho biomarcadores cuyo aumento en la concentración urinaria se correlaciona con precisión con apendicitis aguda. Estos ocho biomarcadores son α 2–glucoproteína rica en leucina (LRG), calgranulina A (S100–A8), α –1–glucoproteína ácida 1 (orosomucoide) (ORM), plasminógeno (PLG), serina proteasa 2 de unión a manosa lectina (MASP2), zinc– α –2–glucoproteína (AZGP1), α –1–antiquimotripsina (SERPINA3) y apolipoproteína D (ApoD). Estas proteínas biomarcadoras de apendicitis han sido confirmadas por inmunotransferencia Western (Ejemplo 2, Fig. 9 y 10) y validadas además por espectrometría de masas dirigida (Ejemplo 2).

20 De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, estos biomarcadores se pueden usar como indicadores de apendicitis aguda. Por la simple medición de los niveles de estos biomarcadores en una muestra de orina de un individuo que tiene algunos síntomas de la apendicitis aguda o que se sospecha que tiene apendicitis aguda, un médico puede hacer un diagnóstico rápido y administrar el tratamiento médico apropiado en el momento oportuno. Cuando los niveles de estos biomarcadores en un individuo son mayores que el nivel de referencia o valor de referencia de los respectivos biomarcadores, al menos un orden de magnitud mayor que la encontrada en individuo sano que no tiene apendicitis aguda, es indicativo de que el individuo de hecho está teniendo apendicitis aguda.

En una realización, un sujeto o individuo es un sujeto mamífero, tal como un humano.

30 Los síntomas no limitantes de la apendicitis aguda incluyen dolor de partida central (periumbilical) antes de la localización de la fosa ilíaca derecha (el lado inferior derecho del abdomen); pérdida de apetito y fiebre; náuseas o vómitos; la sensación de somnolencia; la sensación de mal estado general de salud; dolor que comienza y permanece en la fosa ilíaca derecha, diarrea y, por supuesto latente más prolongado; aumento de la frecuencia de la micción; marcadas arcadas; tenesmo o "impulso a la baja" (la sensación de que un movimiento de intestino aliviará las molestias); signo de Rovsing positivo, signo de Psoas, y/o señal de obturador.

35 Se describe en este documento un kit para predecir la apendicitis aguda en un ser humano que comprende un indicador o dispositivo que es sensible a un nivel de al menos un biomarcador en una muestra de orina de un ser humano al entrar en contacto con la muestra de orina, en donde la proteína biomarcadora de apendicitis en una muestra de orina se selecciona de un grupo que consiste en leucina α –2 glucoproteína (LRG), calgranulina a (S100–A8), α –1–glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc– α –2–glucoproteína (AZGP1), α –1–antiquimotripsina (SERPINA3) y apolipoproteína D (ApoD), y en donde el indicador proporciona un resultado de ensayo positivo cuando el nivel de biomarcador de apendicitis excede un valor de referencia.

45 También se describe un kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, (por ejemplo, un sujeto humano) que son sensibles a al menos un marcador seleccionado de la lista de biomarcadores de apendicitis enumerados en la Tabla 1. El kit o dispositivo para predecir apendicitis aguda en un sujeto puede ser sensible a la leucina α –2 glucoproteína (LRG). El kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, puede responder a la leucina α –2 glucoproteína (LRG) y al menos un marcador seleccionado del α –1– glucoproteína ácida 1 (ORM), y/o lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2). El kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, pueden responder a la leucina α –2 glucoproteína (LRG) y al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en calgranulina A (S100–A8), α –1–glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc– α –2–glucoproteína (AZGP1), α –1–antiquimotripsina (SERPINA3) y apolipoproteína D (ApoD). Como se utiliza en este documento, el término "sensible" se refiere a la capacidad de detectar el nivel de un biomarcador de apendicitis de interés en una muestra de orina.

- Como se describe en este documento, el kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, puede ser sensible a la leucina α -2 glucoproteína (LRG) y al menos 1, o al menos 2 o al menos 3, o al menos 4 o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10 otro(s) marcador(es), en todos y cualquier combinación, seleccionada del grupo que consiste en la lista de biomarcadores enumerado en la Tabla 1. El kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, puede ser sensible a la leucina α -2 glucoproteína (LRG) y al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en molécula de adhesión específica a adipocitos; AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor inter- α - tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción 1 PDZK1; PRIC285; prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VA0D1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; y β -1,3-galactosiltransferasa.
- El indicador puede estar en la forma de una tira de ensayo tal como una de varilla indicadora. La tira de ensayo puede ser un inmunoensayo de flujo lateral (LFIA). La tira de ensayo puede ser un LFIA de doble sándwich. La tira de ensayo puede ser un LFIA competitivo.
- El valor de referencia puede ser un nivel medio del biomarcador de apendicitis en muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda. los seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda no pueden presentar ningún síntoma asociado con apendicitis aguda, como se revela en este documento.
- La capacidad de respuesta del indicador del kit puede ser por medio de un inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un ensayo de inmunoensayo de flujo lateral, también conocido como el ensayo inmunocromatográfico, o tira de ensayo.
- Se describe en este documento un método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano que comprende las etapas de: (a) determinar el nivel de al menos una proteína biomarcadora en una muestra de orina del ser humana; y comparar el nivel de la etapa (a) con un valor de referencia para determinar si el ser humano sufre de apendicitis aguda.
- El método puede comprender además determinar el nivel de albúmina en la muestra de orina del ser humana.
- La muestra de orina puede ser recogida por el ser humano.
- El ser humano puede exhibir al menos un síntoma de apendicitis aguda descrito en este documento.
- El ser humano puede haber tenido un CT no concluyente para determinar la inflamación del apéndice.
- El humano puede no haber tenido un CT para determinar la inflamación del apéndice.
- La determinación del nivel de biomarcadores de apendicitis se puede llevar a cabo con el uso de un inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un ensayo de inmunoensayo de flujo lateral, también conocido como el ensayo inmunocromatográfico, o tira de ensayo. El inmunoensayo de flujo lateral puede ser un ensayo de sándwich de doble anticuerpo, un ensayo competitivo, un ensayo cuantitativo o variaciones de los mismos.
- La proteína biomarcadora de apendicitis puede ser leucina α 2-glucoproteína (LRG). La proteína biomarcadora de apendicitis se puede seleccionar de un grupo que consiste en leucina α -2 glucoproteína (LRG), calgranulina A (S100-A8), α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1), α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) y apolipoproteína D (ApoD). Alternativamente, el biomarcador de apendicitis puede ser seleccionado del grupo de biomarcadores seleccionados de cualquiera de los enumerados en la Tabla 1.
- Para el método y kit o dispositivos descritos anteriormente, diversas combinaciones de biomarcadores de apendicitis pueden ser seleccionados. Por ejemplo: LRG y S100-8A; LRG y ORM; ORM y S100-A8, LRG y PLG; LRG y MASP2; LRG y AZGP1; LRG y SERPINA3; LRG y ApoD; LRG, MASP2 y ORM; ORM y MASP2, LRG, S100-A8 y ORM; LRG, ORM y PLG; LRG, ORM y ApoD; LRG, S100-A8, y PLG; LRG, S100-A8, y ApoD; LRG, S100-A8, ORM y SERPINA3; LRG, S100-8A y SERPINA3; LRG, SERPINA3 y AZGP1; LRG, SERPINA3 y Apo D y así sucesivamente.
- El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar el nivel de α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG) en una muestra de orina del ser humana.
- El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y S100-A8 (calgranulina) en una muestra de orina del ser humana.

El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM) en una muestra de orina del ser humana.

El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y plasminógeno (PLG) en una muestra de orina de un ser humano.

- 5 El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2) en una muestra de orina del ser humana.

El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y zinc α -2-glucoproteína (AZGP1) en una muestra de orina del ser humana.

- 10 El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y la apolipoproteína D (ApoD) en una muestra de orina del ser humana.

El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de ORM y S100-A8 en una muestra de orina del ser humana.

El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG, ORM y S100-A8 en una muestra de orina del ser humana.

- 15 El método de predicción de la apendicitis aguda en un ser humano puede comprender la etapa de determinar los niveles de LRG y α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) en una muestra de orina del ser humana.

Tabla 1. Lista de biomarcadores de apendicitis para uso en los kits, dispositivos y métodos que se describen en este documento para la predicción de la apendicitis aguda en el sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. La SEQ ID NO se refiere a la secuencia de aminoácidos que codifica el biomarcador de proteína.

Biomarcador de proteína	No de acceso	SEQ ID
α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG)	IPI00022417	1
S100-A8 (calgranulina)	IPI00007047	2
α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM)	IP100022429	3
Plasminógeno	IPI00019580	4
Lectina serina proteasa unida a manano 2(MASP2)	IPI00306378	5
Zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1)	IPI00166729	6
Apolipoproteína D (ApoD)	IPI00006662	7
α -1-antiquimotripsina (SERPINA3)	IPI00550991	8
Molécula de adhesión específica a adipocito	IPI00024929	9
AMBP	IPI00022426	10
Proteína similar a amiloide 2	IPI00031030	11
Enzima convertidora de angiotensina 2	IPI00465187	12
BAZ1B	IPI00216695	13
Anhidrasa carbónica 1	IPI00215983	14
CD14	IPI00029260	15
Cromogranina A	IPI00383975	16

ES 2 573 954 T3

Biomarcador de proteína	No de acceso	SEQ ID
FBLN7	IPI00167710	17
FXR2	IPI00016250	18
Hemoglobina α	IPI00410714	19
Hemoglobina β	IPI00654755	20
Proteína antagonista del receptor de interleucina-1	IPI00000045	21
Inhibidor de inter- α -tripsina	IPI00218192	22
Proteína de unión de lipopolisacárido	IPI00032311	23
Receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático	IPI00290856	24
MLKL	IPI00180781	25
Nicastrina	IPI00021983	26
Nueva proteína	IPI00550644	27
Proteína de interacción PDZK1 1	IPI00011858	28
PRIC285	IPI00249305	29
Prostaglandina-H2 D-isomerasa	IPI00013179	30
Rcl	IPI00007926	31
S100-A9	IPI00027462	32
Proteína A amiloide sérica	IPI00552578	33
SLC13A3	IPI00103426	34
SLC2A1	IPI00220194	35
SLC2A2	IPI00003905	36
SLC4A1	IPI00022361	37
SLC9A3	IPI00011184	38
SORBS1	IPI00002491	39
SPRX2	IPI00004446	40
Supervillin	IPI00412650	41
TGFbeta2R	IPI00383479	42
TTYH3	IPI00749429	43
VA0D1	IPI00034159	44
Molécula de adhesión vascular 1	IPI00018136	45
Versicano	IPI00009802	46

Biomarcador de proteína	No de acceso	SEQ ID
VIP36	IPI00009950	47
α -1-glucoproteína ácida 2	IPI00020091	48
β -1,3-galactosiltransferasa	IPI00032034	49

El nivel de referencia o valor de referencia puede tener un nivel de un biomarcador de apendicitis en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, o que no ha sido diagnosticado con apendicitis aguda. Un humano sano es cualquier persona que no presenta los síntomas que es conocido comúnmente para ser asociado con apendicitis aguda como se describe en este documento. El valor de referencia puede ser un nivel medio del biomarcador de apendicitis en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tiene apendicitis aguda o que no han sido diagnosticados con apendicitis aguda. Una población de sujetos sanos que no han sido diagnosticados con apendicitis aguda es al menos cinco seres humanos sanos, al menos 10 seres humanos sanos, preferiblemente 20 o más seres humanos sanos. El nivel medio de la orina de un biomarcador de apendicitis se puede obtener tomando la suma del nivel de un biomarcador de apendicitis de un número de seres humanos, dividido por el número de seres humanos.

El nivel de referencia o el valor de referencia puede ser un nivel normalizado del biomarcador de apendicitis en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, en el que la normalización se lleva a cabo con el nivel de albúmina en la muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, o no ha sido diagnosticado con apendicitis aguda. El valor normalizado de referencia para la leucina α -2 glucoproteína (LRG), calgranulina A (S100-A8), α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), de unión a manosa lectina serina proteasa 2 (MASP2), zinc α -2-glucoproteína (AZGP1), α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) y la apolipoproteína D (ApoD) es 0.001. Cuando el valor normalizado para cualquiera de los biomarcadores se describe de un ser humano es al menos un orden de magnitud mayor que el valor de referencia normalizada, i. e. 0.01 y mayor, esto es indicativo de que el ser humano tiene una apendicitis aguda.

La muestra de orina se puede recoger en medio de la corriente.

La muestra de orina se puede obtener depositando la orina en una varilla indicadora. La tira de ensayo puede ser un ensayo de inmunoensayo de flujo lateral, también conocido como el ensayo inmunocromatográfico. El inmunoensayo de flujo lateral puede ser un ensayo de sándwich de doble anticuerpo, un ensayo competitivo, un ensayo cuantitativo o variaciones de los mismos (véanse las Fig. 11 a 19).

Proteínas biomarcadoras de la apendicitis

Se describen en este documento kits o dispositivos para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano que es sensible a al menos un biomarcador de apendicitis seleccionado de la lista de biomarcadores de apendicitis enumerados en la Tabla 1. El kit o dispositivo para predecir apendicitis aguda en un sujeto puede ser sensible a la leucina α -2 glucoproteína (LRG). El kit o dispositivo para la predicción de la apendicitis aguda en un sujeto, pueden responder a la leucina α -2 glucoproteína (LRG) y al menos un marcador seleccionado de α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM), y/o lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2).

LRG: alfa-2-glucoproteína 1 rica en leucina (LRG) también conocida en la técnica como LRG; HMFT1766; LRG1. La familia de repetición rica en leucina (LRR) de las proteínas, incluyendo LRG1, se ha demostrado que está involucrada en la interacción proteína-proteína, transducción de señales, y adhesión celular y desarrollo. LRG1 se expresa durante la diferenciación de granulocitos.

LRG se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan kits de ensayo disponibles en el mercado, por ejemplo, de Immuno-Biological Laboratories, Inc., Human LRG Assay Kit, catalog number 27769. LRG también se pueden detectar utilizando los kits como se revela en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos en serie No 11/627,164 presentada el 25 de enero, 2007, y la Solicitud provisional de la Patente 60/761,808 presentada el 25 de enero, 2006.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra LRG también son útiles como agentes de unión de proteínas a LRG y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no se limitan a Assay Designs, SIGMA-ALDRICH y Novus Biologicals.

Los anticuerpos o agentes de unión de proteínas que reconocen y se unen específicamente a la proteína LRG1 de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento. SEQ ID NO: 1 es la secuencia de polipéptidos para LRG (alfa-2-glucoproteína rica en leucina) y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

5

MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSSISCQPPAEIPG
 YLPADTVHLAVEFFNLTHLPANLLQGASKLQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPQLRVLDLTRNAL
 TGLPPGLFQASATLDTLVLKENQLEVLEVSWLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPGLLANFTLLRT
 LDLGENQLETLPDLLRGPLQLERLHLEGNKLQVLGKDLLLPQPDRLRYLFLNGNKLARVAAGAF
 QGLRQLDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQPNWDMRDGFDISGNPWICDQNLSDLYRWLQAQKDK
 MFSQNDTRCAGPEAVKQOTLLAVAKSQ

S100A8: S100A8 también conocida en la técnica como sinónimos 60B8AG; CAGA; CFAG; CGLA; CP-10; L1Ag; MA387; MIF; proteína relacionada con el factor inhibidor de la migración 8 (MRP8); NIF; OTTHUMP00000015329; OTTHUMP00000015330; P8; proteína A8 de unión al calcio S100; proteína A8 de unión al calcio S100 (calgranulina A); S100A8; calgranulina A; antígeno de la fibrosis quística.

10

Sin desear estar limitado por la teoría, proteína de unión de calcio S100 A8 (S100 A8), también conocida como proteína relacionada con el factor de inhibidor de la migración (MRP-8) pertenece a la familia S-100 de las proteínas de unión de calcio asociadas con la diferenciación de la célula mieloide. Estas son altamente expresadas en los neutrófilos en reposo, queratinocitos (particularmente en la psoriasis), en la infiltración de macrófagos tisulares y en las células epiteliales en la enfermedad inflamatoria activa. La heterogeneidad de las subpoblaciones de macrófagos en la inflamación crónica o aguda se refleja en diferentes expresiones de MRP8 y proteínas relacionadas con el factor inhibidor de la migración-14 (MRP14). Los fagocitos que expresan MRP8 y MRP14 pertenecen a las células infiltrantes tempranas, mientras MRP8 solo se encuentra en tejidos inflamatorios crónicos. Las funciones parcialmente antagonicas de MRP8, MRP14 y del heterocomplejo MRP8/14 dependiente de Ca²⁺ las hace mediadores versátiles.

15

S100A8 Humano (MRP8) tiene un peso molecular de 11.0kD, mientras que existe MRP14 humano en un 13.3kD y una forma truncada de 12.9kD. Ca²⁺ induce la formación de heterocomplejos de la forma (MRP8) (MRP14) (abreviada MRP8/14), (MRP8)2(MRP14), y (MRP8/14)2. Hay dos motivos EF-mano cada uno en MRP8 y MRP14. MRP14 muestra una mayor afinidad por el calcio que MRP8, y la afinidad de la EF2 terminal C es mayor que la de la EF1 N-terminal. El dominio terminal C también determina principalmente la especificidad de la dimerización. La hélice en EF2 sufre un gran cambio conformacional tras la unión de calcio y puede jugar un papel como un desencadenante para el cambio conformacional inducido por Ca²⁺.

20

25

S100A8 se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan ensayos comerciales, tales como, pero sin limitación, kits de ensayo S100A8 de R & D Systems's Human MIF QUANTIKINE® Kit ELISA. Número del catálogo: DMF00; y BMA Biomedicals, MRP8 Enzyme Immunoassay Código de producto: S-1007. S100A8 también se puede detectar utilizando los kits como se revela en la Patente de los Estados Unidos 7,501,256 y WO/2006/012588.

30

Anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra S100A8 también son útiles como agentes de unión de proteínas a S100A8 y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitados a anticuerpos policlonal y monoclonales comerciales contra S100A8 están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, Assay Designs, SIGMA-ALDRICH, R & D Systems, Novus Biologicals y Santa Cruz Biotechnology.

35

Los anticuerpos o agentes de unión de proteínas que reconocen y se unen específicamente a la proteína S100 A8 de la SEQ ID NO: 2, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, puede ser producida fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de polipéptido para S100 A8 y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLKLLLETECPQYIRKKGADVWFKELD
 INTDGAVNFQEFLILVIKMGVAAHKKSSHEESHKE

ORM: alfa-1-glucoproteína ácida 1 (ORM) también conocida en la técnica como orosomucoide 1, AGP1; AGP-A; ORM1. Este gen codifica una proteína de plasma de fase aguda clave. A causa de su aumento debido a la inflamación aguda, esta proteína se clasifica como un reactante de fase aguda. La función específica de esta proteína aún no se ha determinado; sin embargo, puede estar involucrada en los aspectos de la inmunosupresión.

5 ORM se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan ensayos comerciales, tales como, pero sin limitación, Kit de cuantificación ELISA de Orosomucoide Humano de Genway Biotech, Inc. catálogo No. 40-288-22927F.

10 Los anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra ORM también son útiles como agentes de unión de proteínas con ORM y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitado a Assay Designs, SIGMA-ALDRICH, Novus Biologicals, Lifespan Biosciences, R & D Systems, y Santa Cruz Biotechnology.

Los anticuerpos o agentes de unión de proteínas que reconocen y se unen específicamente a la proteína ORM de la SEQ ID NO: 3, la secuencia de la cual se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de polipéptido para ORM y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MALSWVLTVLSLLPLLEAQIPLCANLVPVPI TNATLDQITGKWFYIASAFRNEEYNKSVQEIQA
 TFFYFTPNKTEDTIFLREYQTRQDQCIYNTTYLNVQRENGTISRIVGGQEHFAHLLILRDTKTY
 MIAFDVNDKKNWGLSVYADKPETTKEQLGEFYEALDCLRI PKSDVVYTDWKKDKCEPLEKQHEK
 15 ERKQEEGES

20 El plasminógeno (PLG): plasminógeno, también conocida en la técnica como PLG o DKFZp779M0222 y es un zimógeno de circulación que se convierte en la plasmina de enzima activa por escisión del enlace peptídico entre arg560 y val561, que está mediada por la uroquinasa (PLAU; MIM 191840) y el activador tisular del plasminógeno (PLAT; MIM 173370). La función principal de la plasmina es disolver los coágulos de la fibrina (véase, por ejemplo, FGA, MIM 134820). La plasmina, como la tripsina, pertenece a la familia de proteinasas serina.

25 PLG se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan ensayos comerciales, tales como, pero sin limitación, kits de ensayo comerciales de Kit de ELISA plasminógeno humano de Alpcó Diagnóstico 41-PLAHU-E01; Kit de ELISA de plasminógeno humano de AMERICAN DIAGNOSTICA, 640; Kit de ensayo colorimétrico de plasminógeno de AMERICAN DIAGNOSTICA, 851; Kit de ensayo de ELISA de antígeno total de plasminógeno humano de Innovative Research, IHPLGKT-TOT. PLG también se puede detectar utilizando los kits como se revela en la Solicitud de Patente Internacional WO/1991/005257 y Solicitud de Patente Europea EP1990914430.

30 Los anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra PLG también son útiles como agentes de unión de proteínas con PLG y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitado a Rockland, Abcam, Assay Designs, EMD Biosciences, SIGMA-ALDRICH, Novus Biologicals, Lifespan Biosciences, R & D Systems, y Santa Cruz Biotechnology.

Los anticuerpos o agentes de unión de proteína que reconocen y se unen específicamente a la proteína PLG de la SEQ ID NO: 4, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de polipéptido para PLG y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MEHKEVLLLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAF
 QYHSKEQQCVIMAENRKSSIIIRMRDVVLFKVKVYLSECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWS
 STSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDNDPQGWCYTTDPEKRYDYCDILECEEEMHCSENGEN
 YDGKISKTMGLECQAWDSQSPHAHGYIPSKFPPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWEL
 CDIPRCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPTHNRTPENFPCKNLD
 ENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQS
 YRGTSSTTTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPNKRWEL
 CNLKKCSGTEASVVAPPVLLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGRATTVTGTPCQDWAAQEPHR
 HSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWYTTNPRKLYDYCDVPQCAAPSFDGKPKQVEPKK
 CPGRVVGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTAAHCLEKSPRPSSYKVIILGAH
 QEVNLEPHVQEIIEVSRLFLEPTRKDIALLLKSSPAVITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGW
 GETQGTFGAGLLKEAQLPVIENTKVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGDGGPLVCFE
 KDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN

5 MASP2: lectina serina peptidasa unida a manano 2 (MASP2) también conocida en la técnica como alias sMAP; MAP19; MASP-2; MASP2 y es un factor Ra-reactivo (RARF) que es un factor bactericida dependiente de complemento que se une a los polisacáridos Ra y R2 expresados por ciertas enterobacterias. El splicing alternativo de este gen da como resultado dos variantes de transcripción codificantes de dos componentes RARF que están implicados en la ruta de la lectina de unión a manano de la activación del complemento. La isoforma más larga se escinde en dos cadenas que forman un heterodímero unido por un enlace disulfuro. Las proteínas codificadas son miembros de la familia de la tripsina de peptidasas.

10 MASP2 se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan ensayos comerciales, tales como, pero sin limitación, kits de ensayo comerciales tales como Human MASP-2 Kit ELISA de Cell Sciences, HK326. MASP2 también se puede detectar utilizando los kits como se revela en la Solicitud de Patente Internacional WO/2007/028795.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra MASP2 también son útiles como agentes de unión de proteínas con MASP2 y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitando a Cell Sciences, USBIO, y Santa Cruz Biotechnology.

15 Los anticuerpos o agentes de unión de proteínas que reconocen y se unen específicamente a la proteína MASP2 de la SEQ ID NO: 5, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de polipéptido para MASP5 y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAPPGYRLRLRYFTHF
 DLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFT
 GFEEFYAAEDIDECQVAPGEAPTCDHHCHNHLGGFYCSCRAGYVLRNKRKRTCSEQSL

20 AZGP1: alfa-2-glucoproteína 1 (AZGP1) también conocida en la técnica como alias zinc-alfa-2-glucoproteína (ZAG); ZA2G; AZGP1, Azgp1, ZNGP1 y Factor (LMF) movilizador de los lípidos. AZGP1 es una glucoproteína de 41 kDa soluble que pertenece a la familia de proteínas de inmunoglobulina y que consiste en una cadena polipeptídica única. ZAG humana comparte 59% de identidad de secuencia con el homólogo murino. AZGP1 está estrechamente relacionado con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y comparte 30 a 40% de identidad de secuencia con la cadena pesada de los miembros de MHC I. La mayoría de los miembros de MHC-I se heterodimerizan con beta-2-microglobulina (b2m) y se unen péptidos derivados de proteínas intracelulares para presentarlos a células T citotóxicas. Por el contrario, AZGP1 es una proteína soluble en lugar de ser anclado a las

membranas plasmáticas que actúa independientemente sobre b2m y une el ligando hidrófobo que puede referirse a su función en el metabolismo lipídico.

5 AZGP1 está muy extendido en los fluidos corporales y también se encuentra en diversos tejidos humanos, tales como tejido adiposo, próstata, mama, piel, glándula salival, tráquea, bronquios, pulmones, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado y riñón. AZGP1 actúa como un factor de movilización de lípidos para inducir la lipólisis en los adipocitos y juega un papel importante en la utilización de los lípidos y la pérdida de tejido adiposo, especialmente durante caquexia, que se produce en paciente que sufre de cáncer, SIDA y otras enfermedades crónicas. El papel de AZGP1 en la caquexia por cáncer también está conectado con su capacidad de influir directamente en la expresión de las proteínas desacoplantes (UCPs), que están implicados en la regulación del balance de energía. En los adipocitos humanos, la expresión de AZGP1 se regula particularmente a través de TNF-alfa y el receptor nuclear gamma PPAR. La expresión de AZGP1 también está regulada positivamente por glucocorticoides y atenuada por el ácido eicosapentaenoico (EPA) y los antagonistas de beta-3-adrenoceptores.

15 AZGP1 se sobreexpresa en ciertos tumores malignos humanos tales como próstata, mama, pulmón o cáncer de vejiga y se puede relacionar con la diferenciación del tumor. Además, AZGP1 juega un papel en la obesidad, trastornos renales diabéticos, demencia frontotemporal y regulación de la producción de melanina por los melanocitos. Se propone que AZGP1 tiene un uso terapéutico de la obesidad y la caquexia. Se puede utilizar como un marcador para el análisis clínico de nefropatía diabética y como un marcador para ciertos tumores.

20 AZGP1 se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan ensayos comerciales, tales como, pero sin limitación, Kit ELISA Zinc-alfa-2-glucoproteína Humana (ZA2G, ZAG), detección de HRP, de BioVendor Laboratory Medicine, Inc., RD191093100R. El ensayo se utiliza para la determinación de Zinc-alfa-2-glucoproteína humana en suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina y lisado celular.; Kit EIA Humano/ratón/rata ZAG de Raybiotech, Inc o Biovendor lab medicine Inc., EIA-ZAG-1

25 Los anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra AZGP1 también son útiles como agentes de unión de proteínas con AZGP1 y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitado a Abcam (anticuerpo zinc alfa 2 glucoproteína, catálogo # ab47116) y Novus Biologicals (anticuerpoAZGP1, catálogo # H00000563-B01). Cell Sciences, USBIO, y Santa Cruz Biotechnology.

Los anticuerpos o agentes de unión de proteína que reconocen y se unen específicamente a la proteína AZGP1 de la SEQ ID NO: 6, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

30 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de polipéptido para AZGP1 y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MVRMVPVLLSLLLLLGPVAPQENQDGRYSLTYIYTGLSKHVEDVPAFQALGSLNDLQFFRYNSK
 DRKSQPMGLWRQVEGMEDWKQDSQLQKAREDI FMETLKDIVEYYNDSNGSHVLQGRFGCEIENN
 RSSGAFWKYYYDGDYIEFNKEI PAWVPFDPAAQITKQWEAEPVYVQRAKAYLEEECPATLRK
 YLKYSKNILDRQDPPSVVVTSHQAPGEKKLKLCLAYDFYPGKIDVHWTRAGEVQEPPELRGDVLH
 NNGTYQSWVVAVPPQDTAPYSCHVQHSSLAQPLVVPWEAS

35 APOD: apolipoproteína D (ApoD o APOD) es un polipéptido que es una lipoproteína de alta densidad que no tiene marcada similitud con otras secuencias de apolipoproteínas. Tiene un alto grado de homología con la proteína de unión a retinol plasma y otros miembros de la superfamilia proteína alfa 2 microglobulina de proteínas portadoras, también conocidas como lipocalinas. Esta glucoproteína está estrechamente asociada con la lecitina de enzima: colesterol aciltransferasa – una enzima implicada en el metabolismo de las lipoproteínas.

ApoD se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan, como se revela en la Solicitud de Patente Internacional WO/1996/019500 o las Patentes de los Estados Unidos 5,804,368 o 5,804,368 o la Patente Europea EP0301667.

40 Los anticuerpos o agentes de unión de proteína que reconocen y se unen específicamente a la proteína ApoD de la SEQ ID NO: 7, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de polipéptido para ApoD y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MVMLLLLLSALAGLFGAAEGQAFHLGKCPNPPVQENFDVNKYLGRWYEIEKIPTTFENGRCIQA
 NYSLMENGKIKVLNQEELRADGTVNQIEGEATPVNLTEPAKLEVKFSWFMPSAPYWILATDYENY
 ALVYSCTCI IQLFHVDFAWILARNPNLPPETVDSLKNILTSNNIDVKKMTVTDQVNCPKLS

5 SERPINA3: α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) es también conocida en la técnica como alias inhibidor de serpina peptidasa, clase A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 3, ACT; AACT; GIG24; GIG25 y MGC88254. El polipéptido SERPINA3 es un inhibidor de la proteasa del plasma y miembro de la clase de los inhibidores de la proteasa serina. Los polimorfismos en esta proteína parecen ser específicos de tejido y la influencia de orientación de la proteasa. Las variaciones en la secuencia de esta proteína se han implicado en la enfermedad de Alzheimer, y la deficiencia de esta proteína se ha asociado con la enfermedad hepática. Las mutaciones se han identificado en pacientes con enfermedad de Parkinson y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

10 SERPINA3 se puede detectar en los métodos, kits y dispositivos que utilizan como se revela en la Solicitud de la Patente Internacional WO/2005/039588.

Anticuerpos policlonales y monoclonales comerciales contra SERPINA3 también son útiles como agentes de unión de proteínas a SERPINA3 y están disponibles de una variedad de compañías, por ejemplo, pero no limitado a Proteintech Group, Lifespan Biosciences, y Santa Cruz Biotechnology.

15 Los anticuerpos o agentes de unión de proteína que reconocen y se unen específicamente a la proteína SERPINA3 de la SEQ ID NO: 8, la secuencia de los cuales se reproduce a continuación, se puede producir fácilmente por un experto normal en el arte y son útiles para los métodos, kits y dispositivos como se describe en este documento.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de polipéptido para SERPINA3 y tiene la secuencia de aminoácidos a continuación:

MKIHYSRQTALESTSYIQLPEAELRMERMLPLLALGLLAAGFCPAVLCHPNSPLDEENLTQENQ
 DRGTHVDLGLASANVDFAFSLYKQLVLKAPDKNVI FSPLS I STALAFLSLGAHNTTLTEILKGL
 KFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNQSSDELQLSMGNAMFVKEQLSLLDRFTEDAKRLYGSEAF
 TDFQDSAAAKKLINDYVKNNGTRGKITDLIKDLDSQTMMLVNYIFFKAKWEMPFPDQDTHQSRF
 YLSKKKWMVPMMSLHHLTIPYFRDEELSCTVVELKYTGNASALFILPDQDKMEEVEAMLLPET
 LKRWRDSLEFREIGELYLPKFSISRDNLNDILLQLGIEEAFTSKADLSGITGARNLAVSQVVH
 KAVLDVFEEGTEASAATAVKITLLSALVETRTIVRFNRPFMIIVPTDTQNIFFMSKVTNPKQA

Medición de los niveles de proteínas biomarcadoras de apendicitis

20 El nivel de proteínas biomarcadoras de apendicitis, tales como los descritos en la Tabla 1, y en particular, los siguientes biomarcadores de apendicitis: leucina α -2 glucoproteína (LRG), calgranulina A (S100-A8), α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1), α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) o apolipoproteína D (ApoD), se puede medir para obtener una determinación de si un paciente humano tiene apendicitis aguda. Un nivel de proteína biomarcadora urinaria puede medirse utilizando cualquier ensayo conocido para los expertos habituales en el arte, incluyendo, pero no limitado a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayos de inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, espectrometría de masas, transferencia de Western, y a mediante de varillas indicadoras utilizando tecnología convencional.

30 Para fines de comparación, los niveles de una proteína biomarcadora de apendicitis en una muestra de orina del paciente deben ser medidos de la misma manera como se mide el valor de referencia. Por ejemplo, los niveles de proteínas biomarcadoras de apendicitis pueden ser representados en unidades arbitrarias que dependen del ensayo utilizado para medir los niveles de proteínas biomarcadoras de apendicitis, por ejemplo, la intensidad de la señal del marcador detectable puede corresponder a la cantidad de proteínas biomarcadoras de apendicitis presentes (por ejemplo, como se determina por el ojo, densitometría, un lector de placas de ELISA, un luminómetro, o un contador de centelleo).

35 Los niveles de una proteína biomarcadora de apendicitis presente en una muestra de orina se puede determinar utilizando cualquier agente de unión de proteína. Un agente de unión de proteína puede ser un ligando que se une

específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis, y puede ser, por ejemplo, un péptido sintético, químico, molécula pequeña, o anticuerpo o fragmento de anticuerpo o variantes del mismo. Un agente de unión de proteína puede ser un ligando o anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y el agente de unión de proteína puede preferiblemente ser marcado de forma detectable.

5 Los inmunoensayos que utilizan anticuerpos se pueden usar para medir los niveles de proteínas de biomarcadores en orina. Como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" se pretende que incluya moléculas de inmunoglobulina y determinantes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) al biomarcador de apendicitis que se va a medir. Se pretende que el término "anticuerpo" incluya anticuerpos enteros, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con proteínas biomarcadoras de apendicitis que se van a medir, por ejemplo, leucina α -2 glucoproteína (LRG), calgranulina A (S100-A8), α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1), α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) o apolipoproteína D (ApoD). Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas recombinante de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una proteína determinada. Los ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, dAbs y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio VL y VH unidos por un enlazante peptídico. Los scFv se pueden unir de forma covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. Por lo tanto, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo" se pretende que incluya además anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, y moléculas quiméricas que tienen al menos un determinante de unión de antígeno derivado de una molécula de anticuerpo. El anticuerpo puede ser marcado de manera detectable.

25 Los anticuerpos para proteínas biomarcadoras de apendicitis se pueden generar utilizando métodos conocidos para los expertos en el arte. Alternativamente, los anticuerpos disponibles en el mercado pueden ser utilizados. Los anticuerpos para LRG, S100-A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3 están disponibles comercialmente.

30 Como se utiliza en este documento "marcado de manera detectable", incluye anticuerpos que están marcados por un medio medibles e incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que son marcados enzimáticamente, radiactivamente, con fluorescencia, y quimioluminiscente. Los anticuerpos también se pueden marcar con una etiqueta detectable, tal como c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5, HIS, o biotina.

En los métodos de diagnóstico descritos que utilizan un anticuerpo para la detección de los niveles de proteínas biomarcadoras, el nivel de proteínas biomarcadoras presentes en las muestras de orina se correlaciona con la intensidad de la señal emitida por el anticuerpo marcado de forma detectable.

35 El anticuerpo se puede marcar de manera detectable por unión del anticuerpo a una enzima. La enzima, a su vez, cuando se expone a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera como para producir una unidad estructural química que se puede detectar, por ejemplo, por espectrofotométricos, fluorométricos o por medios visuales. Las enzimas que se pueden utilizar para marcar de forma detectable los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, isomerasa delta-V-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La quimioluminiscencia es otro método que puede utilizarse para detectar un anticuerpo.

45 La detección también se puede realizar utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente un anticuerpo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de ensayos radioinmunes. El isótopo radiactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autoradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente invención son ³H, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, y preferiblemente ¹²⁵I.

50 También es posible marcar un anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia se puede detectar entonces debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcación fluorescente más comúnmente utilizados son colorantes CYE, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

También se puede marcar un anticuerpo de forma detectable utilizando metales emisores de fluorescencia tales como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando dichos grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Un anticuerpo también puede ser marcado de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcación quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, luciferina, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

5 Los niveles de proteínas biomarcadoras en orina se puede detectar mediante un inmunoensayo. Los inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a inmunoensayo de enzima (EIA), también llamado ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de difusión (DIA), fluoroinmunoensayo (FIA), inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA), inmunoensayo de recuento (CIA), inmunoensayo o pruebas de flujo lateral (LFIA), también conocidos como ensayos de inmunocromatografía de flujo lateral, e inmunoensayo magnético (MIA).

10 Un inmunoensayo es un ensayo bioquímico que mide la concentración de una sustancia en una muestra biológica, por lo general suero u orina, utilizando la reacción de un anticuerpo o anticuerpos a su antígeno. El ensayo se aprovecha de la unión específica de un anticuerpo a su antígeno. Los anticuerpos monoclonales se utilizan a menudo, ya que sólo se unen por lo general a un sitio de una molécula particular, y por lo tanto proporcionan un ensayo más específico y exacto, que es menos fácilmente confundido por la presencia de otras moléculas. Los anticuerpos escogidos deben tener una
15 alta afinidad por el antígeno (si hay antígeno disponible, una proporción muy alta de esta debe unirse al anticuerpo).

Para resultados numéricos, la respuesta de la muestra biológica que se mide debe ser comparado con los estándares de concentración conocida. Esto generalmente se realiza mediante el trazado de una curva estándar en un gráfico, se examina a continuación, la posición de la curva en respuesta de lo desconocido, y así la cantidad de lo desconocido encontrado. Alternativamente, una cantidad definida de anticuerpo se utiliza en el ensayo donde la cantidad definida de
20 anticuerpo se une completamente a una cantidad fija de antígeno. Esta cantidad fija de antígeno es el nivel de referencia de biomarcador en la orina. Por lo tanto, esta cantidad definida de anticuerpo se utiliza para indicar si la cantidad de antígeno en la muestra biológica es al menos en, debajo o por encima del nivel de referencia del biomarcador (véanse las Figs. 11–12).

La detección de la cantidad de antígeno en la muestra biológica se puede lograr mediante una variedad de métodos. Uno de los más comunes es etiquetar ya sea el antígeno o el anticuerpo. El marcador puede constar de una enzima (véase inmunoensayo enzimático (EIA)), oro coloidal (ensayos de flujo lateral), radioisótopos tales como radioinmunoensayo I-¹²⁵ (RIA), marcadores magnéticos (inmunoensayo magnético – MIA) o fluorescencia. Otras técnicas incluyen aglutinación, nefelometría, turbidimetría y transferencia Western.

25 El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo competitivo. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo no competitivo.

Los inmunoensayos se pueden dividir en aquellos que involucran reactivos marcados y los que implican reactivos no marcados. Los que implican reactivos marcados se dividen en inmunoensayos homogéneos y heterogéneos (que requieren una etapa adicional para eliminar el anticuerpo no unido o antígeno del sitio, por lo general utilizando un reactivo de fase sólida). Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos.

35 En un inmunoensayo competitivo, el antígeno en la muestra desconocida compite con el antígeno marcado se une con anticuerpos. A continuación, se mide la cantidad de antígeno marcado unido al sitio de anticuerpo. En este método, la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la desconocida. Esto es porque cuanto mayor sea la respuesta, la menos antígeno en el desconocido estaba disponible para competir con el antígeno marcado.

40 En los inmunoensayos no competitivos, también conocidos como el "ensayo de sándwich", antígeno en el desconocido, por ejemplo, muestra de orina, se une a un primer sitio de anticuerpo, a continuación, el segundo anticuerpo que está marcado está unido al antígeno, formando un sándwich. A continuación, se mide la cantidad de anticuerpo marcado en el sitio. A diferencia del método competitivo, el resultado del método no competitivo será directamente proporcional a la concentración del antígeno. Esto se debe a anticuerpo marcado no se unirá si el antígeno no está presente en la muestra desconocida, por ejemplo, muestra de orina.

45 Los niveles de proteínas biomarcadoras en orina se puede detectar mediante un ensayo ELISA. Hay diferentes formas de ELISA que son bien conocidos para los expertos en el arte, por ejemplo, ELISA estándar, ELISA competitiva, y ELISA sándwich. Las técnicas estándar para ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; and Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22:895–904.

50 El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, también llamado ELISA, inmunoensayo enzimático o EIA, es una técnica bioquímica utilizada principalmente en inmunología para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. El ELISA se ha utilizado como una herramienta de diagnóstico en medicina y patología vegetal, así como un control de calidad en diversas industrias. Para los métodos descritos en este documento, en el ELISA una cantidad

conocida de anticuerpo antibiomarcador está fijado a una superficie sólida, y luego la muestra, por ejemplo, orina, que contiene el biomarcador de interés se lava sobre la superficie de modo que el biomarcador antigénico se puede unir a los anticuerpos inmovilizados (un primer anticuerpo). La superficie se lava para eliminar cualquier biomarcador no unido y también cualquier proteína no biomarcadora presente en la muestra de orina. Un anticuerpo de detección (un segundo anticuerpo) se aplica a la superficie. El anticuerpo de detección es específico para los anticuerpos del sujeto. Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, el anticuerpo de detección debe ser un anticuerpo IgG anti-humano. Si el sujeto es un perro, a continuación, el anticuerpo de detección de anticuerpos IgG anti-perro. Este anticuerpo de detección puede estar ligado a una enzima, y en la etapa final se adiciona una sustancia que la enzima puede convertir en cierta señal detectable. Por ejemplo, en el caso de ELISA de fluorescencia, cuando la luz brilla en la muestra, cualquier complejo antígeno/anticuerpo emite fluorescencia de modo que se puede medir la cantidad de anticuerpos en la muestra.

El siguiente es un protocolo estándar general para el establecimiento y la realización de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima indirecto. El uso de placas de microtitulación de 96 pozos (Falcon Pro-Bindassay plate 3915; Becton Dickinson, Paramus, N.J.), los pozos de ensayo se revisten con anticuerpo antibiomarcador por incubación con 100 μ L de anticuerpo anti-LRG purificada (3 μ g/mL en PBS) por pozo, durante la noche a temperatura ambiente, con PBS sustituido por el anticuerpo en pozos de control. Después de que las placas han sido lavados tres veces con PBS-Tween, se adicionan 250 μ L de 2% de BSA en PBS a cada pozo, y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con la muestra de orina de ensayo y la muestra de control de la orina de individuos sanos diluidos 1:100 en PBS-Tween-BSA; cada muestra de orina se analiza por triplicado en pozos recubiertos con anticuerpos anti-LRG, así como en los pozos de control de PBS. A continuación, la placa se sometió a ensayo (con controles apropiados) para la presencia y/o el nivel de LRG por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ L de conjugado de IgG de cabra anti-LRG con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad, Richmond, Calif.) por pozo diluido 1: 2,000 en PBS-Tween-BSA. Después de tres lavados en PBS-Tween, la solución de sustrato (diclorhidrato de o-fenilendiamina; Sigma) se adiciona a cada pozo. A continuación, las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, y la reacción se termina mediante la adición de ácido sulfúrico 2N. Los valores de densidad óptica a 490 nm (OD490) se miden en un lector de micro placa ELISA. Para cada muestra de orina, se calculan lecturas OD490 medias para los pozos de ensayo y para los pozos de control del antígeno, este último que se restan del anterior para obtener el valor neto de ELISA.

La realización de un ELISA implica al menos un anticuerpo con especificidad para un biomarcador particular. Una cantidad conocida de anticuerpo antibiomarcador se inmoviliza sobre un soporte sólido (generalmente una placa de microtitulación de poliestireno) o bien de forma no específica (a través de la adsorción a la superficie) o específicamente (a través de la captura por otro anticuerpo específico para el anticuerpo antibiomarcador, en un ELISA "sandwich"). Después se inmoviliza el antígeno, se adiciona el anticuerpo de detección, formando un complejo con el antígeno. El anticuerpo de detección puede ser unido covalentemente a una enzima, o puede por sí mismo ser detectado por un anticuerpo secundario que está unido a una enzima a través de bioconjugación. Entre cada etapa la placa se lava por lo general con una solución de detergente suave para eliminar cualquier proteína o anticuerpo que no se unen específicamente. Después de la etapa de lavado final, la placa se desarrolló mediante la adición de un sustrato enzimático para producir una señal visible, lo que indica la cantidad de antígeno en la muestra. Los ELISA mayores utilizan sustratos cromogénicos, aunque nuevos ensayos emplean sustratos fluorogénicos con una sensibilidad mucho mayor.

Se puede utilizar un ELISA competitivo. El anticuerpo antibiomarcador purificado se recubre en la fase sólida de múltiples pozos. Muestra de orina, una cantidad definida de biomarcador purificado y peroxidasa de rábano picante marcada con anticuerpo antibiomarcador (anticuerpo conjugado de detección secundaria) se adicionan a pozos recubiertos para formar combinación competitiva. Después de la incubación, si el nivel de biomarcador en la muestra de orina es alta, se formará un complejo de biomarcador-antibiomarcador anticuerpo-antibiomarcador anticuerpo marcado con HRP. El lavado de los pozos eliminará el complejo. La incubación con TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzideno) resultará en sustrato de revelado de color para la localización de los anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante en los pozos. No habrá ningún cambio de color o poco cambio de color. Si el nivel de biomarcador en la muestra de orina es bajo, no habrá mucho cambio de color. Dicho ensayo de ELISA competitivo es específico, sensible, reproducible y fácil de operar.

Los niveles de proteínas biomarcadoras de apendicitis se pueden determinar poniendo en contacto una muestra de orina con un primer anticuerpo que se une específicamente a una proteína biomarcadora que se va a medir, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y las proteínas biomarcadoras de apendicitis (por ejemplo, LRG, S100-A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3). La cantidad de complejo formado se mide entonces como una medida del nivel de la proteína biomarcadora de apendicitis, y la cantidad de complejo formado se compara con la cantidad de complejo formado entre el primer anticuerpo y una cantidad de referencia predeterminado de la proteína biomarcadora de apendicitis. Esta cantidad de nivel de referencia predeterminada de la proteína biomarcadora de apendicitis es la cantidad que se encuentra en la orina de los seres humanos sanos. Un nivel

por encima de la cantidad del nivel de referencia de una proteína biomarcadora de apendicitis indica que el ser humano tiene una apendicitis aguda.

5 El primer anticuerpo se puede marcar para su detección. La marcación de forma detectable del primer anticuerpo es apropiada para su uso, por ejemplo, en ensayos de ELISA estándar donde la proteína biomarcadora se absorbe a una placa de ELISA, o en el análisis de transferencia Western, o cierto análisis de varilla indicadora LFIA.

10 El primer anticuerpo se puede movilizar sobre un soporte sólido, por ejemplo, cuando se utiliza un "ELISA Sandwich" o un análisis de varilla indicadora, entonces la cantidad de complejo formado se puede medir mediante la detección de la unión de un segundo anticuerpo que se une específicamente a la proteína biomarcadora de apendicitis (por ejemplo, LRG, S100– A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3) en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el segundo anticuerpo y la proteína biomarcadora de apendicitis, en donde el segundo anticuerpo no reacciona sustancialmente en cruz con el primer anticuerpo, y en donde el segundo anticuerpo está marcado de forma detectable.

15 Se puede utilizar cualquier soporte sólido, incluyendo, pero no limitando a, nitrocelulosa, polímeros orgánicos sólidos, tales como poliestireno, o varillas indicadoras laminadas tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos 5,550,375 y 5,656,448.

20 Los niveles de dos proteínas biomarcadoras de apendicitis que definen una primera y una segunda proteína biomarcadora de apendicitis, se puede medir utilizando al menos dos anticuerpos específicos para cada proteína biomarcadora de apendicitis que se va a medir. Cada anticuerpo reacciona específicamente ya sea con la primera proteína biomarcadora de apendicitis o la segunda proteína biomarcadora de apendicitis que se va a medir, mientras que no reacciona sustancialmente en cruz con las otras proteínas biomarcadoras de apendicitis que se van a medir.

25 Los niveles de tres proteínas biomarcadoras que definen una primera proteína biomarcadora, una segunda proteína biomarcadora, y una tercera proteína biomarcadora, se puede medir utilizando al menos tres anticuerpos específicos para cada proteína biomarcadora que se va a medir, en donde cada anticuerpo reacciona específicamente ya sea la primera proteína biomarcadora, la segunda proteína biomarcadora, o la tercera proteína biomarcadora que se va a medir, mientras que no reacciona sustancialmente en cruz con las otras proteínas biomarcadoras que se va a medir.

30 Los niveles de cuatro proteínas biomarcadoras que definen una primera, una segunda, tercera y cuarta proteína de biomarcador, se puede medir utilizando al menos cuatro anticuerpos específicos para cada proteína biomarcadora que se va a medir, en donde cada anticuerpo reacciona específicamente ya sea con la primera proteína biomarcadora, la segunda proteína biomarcadora, la tercera proteína biomarcadora, o la cuarta proteína biomarcadora que se va a medir, mientras que no reacciona sustancialmente en cruz con las otras proteínas biomarcadoras que se van a medir.

Las proteínas biomarcadoras de apendicitis se pueden seleccionar del grupo que consiste en LRG, S100– A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3.

35 Los niveles de proteínas biomarcadoras en la orina pueden ser detectados mediante un ensayo de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA), también conocido como el ensayo inmunocromatográfico, o tira de ensayo. Las LFIA son un simple dispositivo destinado a detectar la presencia (o ausencia) de un antígeno diana en una muestra de fluido. En este momento hay muchos ensayos LFIA se utilizan para el diagnóstico médico, ya sea para los ensayos en el hogar, el punto de atención de los ensayos, o el uso de laboratorio. Los ensayos de LFIA son una forma de inmunoensayo en la que fluye la muestra de análisis a lo largo de un sustrato sólido a través de la acción capilar. Después la muestra se aplica al ensayo se encuentra con un reactivo de color que se mezcla con la muestra y transita el sustrato que se encuentra con líneas o zonas que han sido tratados previamente con un anticuerpo o antígeno. Dependiendo de los antígenos presentes en la muestra del reactivo de color puede llegar a ser unido a la línea o la zona de ensayo. Los LFIA son esencialmente inmunoensayos adaptados para operar en un solo eje para adaptarse al formato de tira de ensayo o un formato de varilla indicadora. Las tiras de ensayo son extremadamente versátiles y pueden ser modificadas fácilmente por un experto en el arte para detectar un enorme rango de antígenos de muestras de fluidos tales como muestras de orina, sangre, agua etc. Las tiras de ensayo son conocidos también como prueba de varilla indicadora, el nombre que alberga desde la acción literal de "inmersión" de la tira de ensayo en una muestra de fluido que se va a analizar. Las tiras de ensayo LFIA son fáciles de usar, requieren una formación mínima y puede ser fácilmente incluido como componentes pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT) para ser usadas en sitio en acción.

50 Las pruebas LFIA pueden funcionar ya sea como ensayos competitivos o sándwich. Las LFIA Sandwich son similares a ELISA sándwich. La primera muestra encuentra partículas coloreadas que están marcados con anticuerpos para el antígeno diana. La línea de ensayo también contendrá anticuerpos para la misma diana, a pesar de que se puede unir a un epítipo diferente en el antígeno. La línea de ensayo se mostrará como una banda de color en las muestras positivas. El ejemplo 5 ilustra una LFIA sándwich en el formato de tira de ensayo. LFIA competitivos son similares a ELISA competitivo. La primera muestra encuentra las partículas de color que se marcan con el antígeno diana o un análogo. La

línea de ensayo contiene anticuerpos a la diana/su análogo. El antígeno no marcado en la muestra bloqueará los sitios de unión en los anticuerpos que impiden la absorción de las partículas coloreadas. La línea de ensayo se mostrará como una banda de color en las muestras negativas.

5 Una tira de ensayo típica consiste en los siguientes componentes: (1) La zona de aplicación de la muestra que comprende una almohadilla absorbente (i. e. la matriz o material) sobre el que se aplica la muestra de análisis; (2) almohadilla de reactivo o conjugado –esta contiene anticuerpos específicos para el antígeno diana conjugado con partículas de color (generalmente partículas coloidales de oro, o microesferas de látex); área de resultados del ensayo, que comprende una membrana de reacción– por lo general una nitrocelulosa hidrófoba o membrana de acetato de celulosa en la que los anticuerpos anti–antígeno se inmovilizan en una línea a través de la membrana como una zona de captura o línea de prueba (una zona de control también puede estar presente, conteniendo anticuerpos específicos para los anticuerpos del conjugado); y (4) la mecha opcional o depósito de residuos – una almohadilla absorbente adicional diseñada para extraer la muestra a través de la membrana de reacción por acción capilar y recogerla. Los componentes de la tira generalmente se fijan a un material de soporte inerte y se pueden presentar en un formato de varilla indicadora simple o dentro de una carcasa de plástico con un puerto de muestra y una ventana de reacción que muestra las zonas de captura y control. Aunque no es estrictamente necesario, la mayoría de las pruebas incorporarán una segunda línea que contiene un anticuerpo que recoge libre de látex/oro con el fin de confirmar que la prueba ha funcionado correctamente. Las figs. 11 –19 muestran los diversos componentes de varias tiras de ensayo.

El inmunoensayo de flujo lateral puede ser un ensayo de sándwich de doble anticuerpo, un ensayo competitivo, un ensayo cuantitativo o variaciones de los mismos. Las figs. 15, 16, 17, el Ejemplo 5 y el Ejemplo 6 ilustran LFIA sándwich de doble anticuerpo en un formato de tira de ensayo.

25 Existe una serie de variaciones sobre la tecnología de flujo lateral. También es posible aplicar varias zonas de captura para crear un ensayo multiplex. Las figs. 14 y 19 ilustran un LFIA múltiplex en un formato de tira de ensayo. Un kit de diagnóstico puede comprender múltiples tiras de ensayo LFIA, una tira para una proteína biomarcadora diferente. Un kit de diagnóstico puede comprender una única tira de ensayo LFIA compuesta, para determinar los niveles de varias proteínas biomarcadoras. Tales kits de diagnóstico y tiras de ensayo LFIA se pueden utilizar como POCT en acción.

30 El uso de "varillas indicadoras" o tiras de ensayo LFIA y otros soportes sólidos se han descrito en la técnica en el contexto de un inmunoensayo para una serie de antígenos. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,943,522; 6,485,982; 6,187,598; 5,770,460; 5,622,871; 6,565,808, las solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Ser. No. 10/278,676; U.S. Ser. No. 09/579,673 y U.S. Ser. No. 10/717,082, son ejemplos no limitantes de dichos dispositivos de ensayo de flujo lateral. Tres Patentes de los Estados Unidos (Patente de los Estados Unidos No. 4,444,880, concedida a H. Tom; Patente de los Estados Unidos No. 4,305,924, concedida a R. N. Piasio; y Patente de los Estados Unidos No. 4,135,884, concedida a J. T. Shen) describen el uso de tecnología "varilla indicadora" para la detección de antígenos solubles mediante ensayos inmunoquímicos. Los aparatos y los métodos de estas tres patentes en general describen un primer componente fijo a una superficie sólida en una "varilla indicadora" que se expone a una solución que contiene un antígeno soluble que se une al componente fijo de la "varilla indicadora", antes de la detección del complejo antígeno componente en la varilla.

40 Una varilla indicadora de orina es un ensayo colorimétrico químico que puede ser utilizado para determinar el pH, gravedad específica, proteína, glucosa, cetona, bilirrubina, urobilinógeno, sangre, leucocitos, y niveles de nitrito de la orina de un individuo. Se compone de una varilla–almohadilla de reactivo, que se sumerge en una muestra de orina fresca y luego se retira. Después de tiempos predeterminados los colores de la almohadilla de reactivo se comparan con tablas de referencia estandarizadas.

45 La varilla indicadora de orina ofrece un método barato y rápido para realizar análisis de orina de detección, que ayudan en la identificación de la presencia de varias enfermedades o problemas de salud. Una varilla indicadora de orina proporciona una guía de diagnóstico simple y clara y se puede utilizar en los métodos y kits como se describe en este documento. Se describe en este documento un método para detectar la apendicitis aguda utilizando un dispositivo, tal como una de varilla indicadora, para analizar la presencia de biomarcadores de apendicitis como se describe en este documento. Las tiras de ensayo se pueden utilizar para analizar al menos un biomarcador de apendicitis, por ejemplo LRG o múltiples biomarcadores, tales como cualquier combinación seleccionada del grupo de α -2–glucoproteína rica en leucina (LRG); S100–A8 (calgranulina); α -1–glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc– α -2–glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1–antiquimotripsina (SERPINA3), o alternativamente, múltiples biomarcadores seleccionados de cualquier combinación enumerada en la Tabla 1. Se puede utilizar una combinación de tiras de ensayo para analizar al menos dos biomarcadores de apendicitis seleccionados del grupo de α -2–glucoproteína rica en leucina (LRG); S100–A8 (calgranulina); α -1–glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc– α -2–glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1–antiquimotripsina (SERPINA3), o alternativamente, múltiples biomarcadores seleccionados de cualquier combinación enumerada en la Tabla 1. Ejemplos de combinaciones de dos biomarcadores de apendicitis son LRG y ORM; LRG y S100–A8; LRG y PLG; LRG y MASP2; LRG y AZGP1; LRG y ApoD; LRG y

SERPINA3; ORM y S100-A8; ORM y PLG; ORM y MASP2; ORM y ApoD; ORM y SERPINA3; S100-A8 y PLG; S100-A8 y MASP2; S100-A8 y ApoD; S100-A8 y SERPINA3; PLG y MASP2; PLG y ApoD; PLG y SERPINA3; MASP2 y ApoD; MASP2 y SERPINA3; y Apo y SERPINA3. La combinación de tira de ensayo se puede utilizar para analizar al menos tres biomarcadores de apendicitis, al menos cuatro biomarcadores de apendicitis, al menos cinco biomarcadores de apendicitis, o al menos seis biomarcadores de apendicitis seleccionados del grupo de α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3), o alternativamente, múltiples biomarcadores seleccionados de cualquier combinación enumerada en Tabla 1. La combinación de tiras de ensayo se puede utilizar para analizar al menos siete biomarcadores de apendicitis seleccionados del grupo de α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3), o alternativamente, múltiples biomarcadores seleccionados de cualquier combinación enumerada en Tabla 1. Un ejemplo de una combinación de siete biomarcadores de apendicitis es LRG, ORM, S100-A8, PLG, MASP2, ApoD, y SERPINA3. Usos de varillas indicadoras se conocen comúnmente en la técnica, y se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,972,594 de Heine, que se utiliza para detectar la presencia de las defensinas de neutrófilos para diagnosticar inflamación del tracto reproductivo y preeclampsia.

Otras varillas indicadoras y los componentes relacionados son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, varillas indicadoras para detectar leucocitos y enzimas de leucocitos en los fluidos corporales han sido patentados. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,656,448 de Kang et al, revela una varilla indicadora para su uso en la presente invención. Además, la Patente de los Estados Unidos No.4,758,508 de Schnabel, et al. describe un agente y un método para detectar enzimas estereolíticas y/o proteolíticas en fluidos corporales. La Patente de los Estados Unidos No. 4,637,979 de Skjold, et al. describe una composición y dispositivo de prueba para determinar la presencia de leucocitos en muestras de ensayo incluyendo fluidos corporales tales como orina. La Patente de los Estados Unidos No. 4,645,842 describe compuestos de pirrol, y la Patente de los Estados Unidos No. 4,704,460 (ambas de Corey) describe compuestos novedosos para detectar la presencia de analitos hidrolíticos incluyendo leucocitos, estearasa, y proteasa, en una muestra de análisis, incluyendo orina. La Patente de los Estados Unidos No. 4,774,340 de Corey describe un método de preparación 3-hidroxi pirroles y ésteres de los mismos, que se utilizan para analizar muestras incluyendo orina. Una composición y dispositivo de prueba para determinar la presencia de leucocitos, estearasa, y proteasa en un fluido corporal incluyendo orina se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,657,855 de Corey, et al. Un método para determinar la concentración de células blancas de la sangre en la orina u otro fluido biológico se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,663,044 de Noffsinger, et al. Un método de preparación de un éster utilizado para detectar las células de leucocitos, estearasa, y proteasa en fluidos corporales tales como la orina se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,716,236 de Ward, et al. Todas estas patentes identifican un nivel anormalmente alto de leucocitos en la orina de un paciente y producir una señal para identificar la probabilidad de que el sujeto del que se obtuvo la orina tiene un estado patológico tal como riñón o infección del tracto urogenital u otra disfunción.

Se describe en este documento un dispositivo LFIA tal como una de varilla indicadora para identificar biomarcadores de apendicitis en una muestra de análisis de orina. Se describe un método para la detección de apendicitis aguda utilizando un dispositivo LFIA, tal como una de varilla indicadora, que tiene reactivos de prueba de diagnóstico para detectar la apendicitis aguda. Los reactivos de prueba de diagnóstico reaccionan con la muestra de análisis, tal como muestra de análisis de orina para producir un cambio al entrar en contacto con la muestra de análisis, tal como orina. También se describe un dispositivo, tal como una de varilla indicadora, que tiene (1) una indicación positiva de la presencia de apendicitis aguda y (2) una indicación negativa por la ausencia de apendicitis aguda. La diferencia entre la indicación positiva y la indicación negativa es predeterminada.

También se describe un método para determinar si un sujeto tiene una probabilidad de apendicitis aguda. El método puede comenzar con la obtención de una muestra de orina de un sujeto, tal como un paciente sintomático de la apendicitis. Los pacientes sintomáticos de la apendicitis se describen en este documento. Una vez que se obtiene la muestra, un dispositivo que tiene reactivos de prueba de diagnóstico que detectan la presencia de al menos un biomarcador de apendicitis, tal como α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) o cualquier listado de la Tabla 1 se pone en contacto con la muestra de orina. Dependiendo del tipo de dispositivo utilizado, una cierta cantidad de tiempo podría tener que pasar antes de que se lee el dispositivo. Por ejemplo, como una guía general, pero no como una limitación, cuando se utiliza un MULTISTIX-2 por Bayer Aktiengesellschaft (Fed. Rep. Germany) pasan dos minutos entre el momento en que el dispositivo se pone en contacto con la muestra y cuando se lee para producir un resultado de la prueba experimental. La varilla indicadora MULTISTIX-2 se vende para analizar la orina. A continuación, el resultado de la prueba experimental se compara con resultados de pruebas determinadas que indican ya sea la presencia o ausencia de apendicitis aguda.

El método para diagnosticar apendicitis aguda en un sujeto puede utilizar un dispositivo cuantitativo (tal como, por ejemplo, MULTISTIX-2, MULTISTIX-10, URISTIX-4, o cualquier dispositivo de detección de biomarcadores de apendicitis como se describe en este documento) o el dispositivo del sujeto que tiene dos indicaciones, una para un resultado positivo y uno para un resultado negativo. Cuando se utiliza dicho dispositivo cuantitativo, se produce un rango de resultados. Por ejemplo, el MULTISTIX-2 produce resultados cuantitativos de 0, trazas, +1, +2 y +3. Los resultados cuantitativos también incluyen "Entre +1 y +2" y "Entre +2 y +3". Un resultado de 0, trazas y el +1 corresponde a la ausencia de la apendicitis aguda). Un resultado de "Entre +1 y +2", "Moderado (+2)", "Entre +2 y +3", y "Grande (+3)" corresponde a la presencia de apendicitis aguda). La pre-determinación se realiza mediante un estudio donde el rango de la presencia marcador de orina se determina con base en el rango en la orina de los sujetos con apendicitis confirmados en comparación con el rango del productor de la orina en la orina de sujetos salud (i.e. confirmados sin apendicitis).

Un dispositivo, tal como un dispositivo inmunológico de varilla indicadora tal como se describe en este documento puede incluir (1) una matriz (preferiblemente papel filtro) con reactivos de prueba de diagnóstico y (2) un sustrato de montaje (preferiblemente película de poliestireno), que por lo general no absorben la muestra de ensayo (por ejemplo, orina), de tal manera que el usuario puede sostener sobre el sustrato sin contacto de la muestra. El dispositivo produce un cambio visual en la matriz al entrar en contacto con la muestra de orina. La matriz puede tener dos indicadores de una primera que indica la presencia de apendicitis aguda y una segunda que indica la ausencia de apendicitis. El primer indicador produce un resultado de la prueba positivo y el segundo indicador produce un resultado negativo. El resultado de la prueba es positivo cuando el resultado de la prueba está predeterminado para que se corresponda con un nivel del biomarcador de apendicitis que es indicativo de apendicitis aguda. Por el contrario, un resultado de la prueba es negativo cuando el resultado de la prueba es predeterminado para estar por debajo del nivel de un biomarcador de apendicitis que indica la ausencia de apendicitis aguda. El dispositivo, tal como un dispositivo de varilla indicadora determina la presencia de apendicitis aguda con el resultado de la prueba positivo, y la ausencia de apendicitis aguda con el resultado negativo de la prueba.

Los reactivos de prueba de diagnóstico pueden estar asociados con la matriz por cualquier medio físico o químico, incluyendo, por ejemplo, impregnación, recubrimiento, enlace, y unión covalente. La matriz puede adoptar cualquier forma física conveniente, tal como una tarjeta, almohadilla, tira o varilla indicadora. Tales reactivos de prueba de diagnóstico incluyen las composiciones de las patentes mencionadas anteriormente, incluyendo un éster (preferiblemente un éster cromogénico) y una sal de diazonio tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 4,637,979. Otro reactivo preferido es un éster de aminoácido derivado de pirrol, una sal de diazonio, una solución reguladora, y los ingredientes no reactivos como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,645,842; 4,637,979; 4,657,855; 4,704,460; 4,758,508; y 4,774,340. Las cantidades preferidas de estos ingredientes se basan en el peso seco en el momento de la impregnación y es el siguiente: aproximadamente 0.4% p/p éster de aminoácido derivado de pirrol, aproximadamente 0.2% p/p de sal de diazonio, aproximadamente 40.9% p/p de solución reguladora, y aproximadamente 58.5% p/p de ingredientes no reactivos.

El reactivo de ensayo, por ejemplo, el anticuerpo anti-antígeno del inmunoensayo puede ser marcado de manera detectable. El marcador detectable se puede seleccionar de un grupo que consiste en enzima, fluorescente, biotina, oro, látex, hapteno y radioisótopo marcado. Un hapteno detectable incluye, pero no se limita a la biotina, fluoresceína, digoxigenina, dinitrofenilo (DNP). Otros marcadores incluyen, pero no se limitan a oro coloidal y perlas de látex. Las perlas de látex también pueden ser de color. Los métodos de anticuerpos de marcación, unidades estructurales basadas en anticuerpos, o proteínas son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en "Colloidal Gold. Principles. Methods and Applications", Hayat MA (ed) (1989-91). Vols 1-3, Academic press, London; in "Techniques in Immunocytochemistry", Bullock GR and Petrusz P (eds) (1982-90) Vols 1, 2, 3, and 4, Academic Press, London; in "Principles of Biological Microtechnique", Baker JR (1970), Methuen, London; Lillie RD (1965), Histochemical Technique and practical Histochemistry, 3rd ed, McGraw Hill, New York; Berryman MA, et al (1992), J. Histochem Cytochem 40, 6, 845-857.

El marcador detectable puede ser un colorante. Un "colorante" se refiere a una sustancia, compuesto o partícula que puede ser detectado, en particular por medios visuales, fluorescentes o instrumentales. Un colorante puede ser, por ejemplo, pero no limitando a, un pigmento producido como un agente colorante o tinta, como por ejemplo Brilliant Blue, 3132 Fast Red 2R y 4230 Malachite Blue Lake, todos disponibles de Hangzhou Hongyan Pigmento Chemical Company, China. El "tinte" también puede ser un marcador de partículas, tal como, pero no limitando a, azul perlas de látex o partículas de oro. Las etiquetas de partículas pueden o no pueden estar unidas a una proteína, dependiendo de si se desea que las partículas se muevan en la tira de ensayo o no. Si las partículas han de ser inmovilizado en la tira de ensayo, las partículas pueden ser conjugados a una proteína, por ejemplo, el anticuerpo anti-antígeno, que a su vez está unido a la tira de ensayo por medios físicos o químicos.

En la técnica de marcación con oro coloidal, el color rojo único del marcador de oro acumulado, cuando se observa por el flujo lateral o transversal a lo largo de una membrana en la que un antígeno es capturado por un anticuerpo inmovilizado, o mediante la observación de la intensidad del color rojo en solución, proporciona un método

extremadamente sensible para detectar cantidades de sub nanogramos de proteínas en solución. Un conjugado de oro coloidal consiste en una suspensión de partículas de oro recubiertas con una proteína o macromolécula seleccionada (tal como un anticuerpo o una unidad estructural basada en anticuerpos). Las partículas de oro se pueden fabricar en cualquier tamaño elegido 1–250 nm. Este sistema de detección de sonda de oro, cuando se incubaron con un objetivo específico, tal como en una sección de tejido, revelará el objetivo a través de la visibilidad de las propias partículas de oro. Para la detección por el ojo, las partículas de oro también revelarán antígeno inmovilizado sobre una fase sólida tal como una membrana de transferencia a través del color rojo acumulado del sol. de oro. La plata mejora de este precipitado de oro también le da aún más la sensibilidad de la detección. Los proveedores de reactivos de oro coloidal para la marcación están disponibles de SPI-MARK™. Tamaño del grano 200 nm de látex de poliestireno de perla de látex de color recubierta con un anticuerpo SIGMA ALDRICH®, Molecular Probes, Bangs Laboratory Inc., y AGILENT® Technologies.

Otros sistemas de detección también se pueden utilizar, por ejemplo, un sistema de biotina–estreptavidina. En este sistema, los anticuerpos inmunorreactivos (i. e. específico para) con el biomarcador de interés está biotinilado. La cantidad de anticuerpo biotinilado unido al biomarcador se determina utilizando un conjugado de estreptavidina–peroxidasa y un sustrato cromogénico. Tales kits de detección de peroxidasa de estreptavidina están comercialmente disponibles, por ejemplo, de DAKO; Carpintería, CA.

Los agentes de unión de proteínas descritos en este documento tales como anticuerpos y unidad estructural basada en anticuerpos, alternativamente, pueden ser marcados con cualquiera de un número de compuestos fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína, europio, amarillo lucifer, rodamina B isotiocianato (Wood, P. In: Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, New York, páginas 365–392 (1991)) para su uso en inmunoensayos. En combinación con las técnicas conocidas para la separación de los complejos anticuerpo–antígeno, estos fluoróforos se pueden usar para cuantificar el biomarcador de interés. Lo mismo aplica a inmunoensayo quimioluminiscente en cuyo caso el anticuerpo o biomarcador de interés se pueden marcar con isoluminol o ésteres de acridinio (Krodel, E. et al., In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status. John Wiley and Sons Inc. New York, pp 107–110 (1991); Weeks, I. et al., Clin. Chem. 29:1480–1483 (1983)). Radioinmunoassay (Kashyap, M. L. et al., J. Clin. Invest, 60:171–180 (1977)) es otra técnica en la que el anticuerpo se puede utilizar después de marcar con un isótopo radioactivo tal como ¹²⁵I. Algunos de estos inmunoensayos se pueden automatizar fácilmente por el uso de instrumentos apropiados, como la IMX™ (Abbott, Irving, Tex.) para un inmunoensayo fluorescente y Ciba Coming ACS 180™ (Ciba Corning, Medfield, Mass.) para un inmunoensayo quimioluminiscente.

Una "tira de ensayo LFIA" o "varilla indicadora" pueden incluir uno o más materiales o matrices absorbentes o no absorbentes. En referencia a una "tira de ensayo LFIA" o "varilla indicadora", los términos "material" y "matriz" se utilizan indistintamente. Si una tira de ensayo comprende más de un material, el uno o más materiales están preferiblemente en comunicación de fluido. Un material de una tira de ensayo puede ser superpuesto sobre otro material de la tira de ensayo, tal como, por ejemplo, papel de filtro superpuesta sobre membrana de nitrocelulosa. Alternativamente, o, además, una tira de ensayo puede incluir una región que comprende uno o más materiales seguido de una región que comprende uno o más materiales diferentes. En este caso, las regiones están en comunicación de fluido y pueden o no solaparse parcialmente entre sí. Los materiales apropiados para las tiras de ensayo incluyen, pero no se limitan a, materiales derivados de celulosa, tales como papel de filtro, papel cromatográfico, nitrocelulosa y acetato de celulosa, así como los materiales de fibra de vidrio, nylon, dacron, PVC, poliacrilamida, dextrano reticulado, agarosa, poliacrilato, materiales cerámicos, y similares. El material o materiales de la tira de ensayo puede estar opcionalmente tratadas para modificar sus características de flujo capilar o las características de la muestra aplicada. Por ejemplo, la región de aplicación de muestra de la tira de ensayo se puede tratar con soluciones reguladoras para corregir el pH o la gravedad específica de una muestra de orina aplicada, para garantizar las condiciones de ensayo óptimas.

El material o materiales pueden ser una sola estructura tales como un corte de hoja en tiras o puede haber varias tiras o material particulado unidos a un soporte o superficie sólida, tal como se encuentra, por ejemplo, en la cromatografía en capa fina y pueden tener una almohadilla absorbente, ya sea como una parte integral o en contacto con el líquido. El material también puede ser una lámina que tiene carriles de la misma, capaz de detectar para inducir la formación de carril, en donde un ensayo separado se puede llevar a cabo en cada carril. El material puede tener una forma rectangular circular, oval, triangular u otra forma a condición de que haya al menos una dirección de recorrido de una solución de ensayo por migración capilar. Otras direcciones de recorrido pueden ocurrir por ejemplo en una pieza ovalada o circular en contacto en el centro con la solución de ensayo. Sin embargo, la consideración principal es que haya al menos una dirección de flujo a un sitio predeterminado.

El soporte para la tira de ensayo, cuando se desea o es necesario un soporte, será normalmente insolubles en agua, con frecuencia no poroso y rígido, pero puede ser elástica, por lo general hidrofóbico, y porosa y por lo general será de la misma longitud y anchura como la tira, pero puede ser mayor o menor. El material de soporte puede ser transparente, y, cuando un dispositivo de prueba está montado, un material de soporte transparente puede estar en el lado de la tira de ensayo que puede ser visto por el usuario, de manera que el material de soporte transparente forma una capa protectora sobre la tira de ensayo donde pueda estar expuesto al entorno externo, tales como mediante una abertura en

la parte frontal de un dispositivo de prueba. Una amplia variedad de materiales, tanto naturales como sintéticos, y combinaciones de los mismos, podrán utilizarse, sólo a condición de que el soporte no interfiere con la acción capilar del material o materiales, o los componentes del ensayo unidos no específicamente, o interferir con el sistema de producción de señal. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli (4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli (tereftalato de etileno), nylon, poli (butirato de vinilo), vidrio, cerámica, metales, y similares. Los soportes elásticos pueden estar hechos de poliuretano, neopreno, látex, caucho de silicona y similares.

Un dispositivo de varilla indicadora puede tener una indicación de la presencia de apendicitis aguda y una segunda indicación de la ausencia de la apendicitis aguda. Las dos indicaciones son preferiblemente un símbolo negativo (-) y un símbolo positivo (+), pero podría ser cualquiera de las dos indicaciones. El dispositivo puede tener la indicación negativa (por ejemplo, la parte "-" de un símbolo "+" posible) que contiene los reactivos que reacciona con todas las muestras. Es decir, los reactivos de prueba de diagnóstico reaccionan con algunos analitos constituyentes, tales como urea que está presente en todas las muestras de orina. Alternativamente, los reactivos de prueba de diagnóstico prueban un aspecto de la muestra, tales como pH, que cada muestra tiene. La indicación positiva (por ejemplo, la parte "+" de un símbolo "+") puede contener un reactivo que reacciona solamente con una muestra que contiene la presencia de un biomarcador de apendicitis de ensayo que está por encima de un cierto nivel predefinido, tal que reacciona en muestras de orina que sólo contienen la presencia de un biomarcador de apendicitis de prueba (i.e. de un biomarcador LRG) por encima de un cierto nivel, i.e., por encima de un nivel predefinido del biomarcador de apendicitis. Otro dispositivo tiene el indicador negativo (por ejemplo, la parte "-" de un símbolo "+" posible) que contiene los reactivos que reaccionan con la muestra que o bien tiene la ausencia del biomarcador de apendicitis de ensayo (i.e., ausencia de un biomarcador LRG) o el nivel del biomarcador de apendicitis de prueba (i.e., el biomarcador LRG) por debajo de un cierto nivel predefinido o umbral. La indicación positiva (por ejemplo, el parte "+" del símbolo "+") tiene una menor sensibilidad a la presencia de un biomarcador de apendicitis de prueba (i.e., biomarcador LRG) y por lo tanto, tales reactivos reaccionan solamente con muestras de orina que contienen nivel del marcador de orina (i.e., biomarcador LRG) por encima de un nivel predefinido.

Un dispositivo de prueba, tal como un dispositivo de varilla indicadora puede tener texto en el dispositivo en dos lugares. En un lugar del texto indica un resultado positivo (i.e., la probabilidad de que el sujeto tiene apendicitis aguda). En otro, se indica un resultado negativo (i.e., la probabilidad de que el sujeto no tiene apendicitis aguda). Al lado de las indicaciones están las matrices que tienen los reactivos de las pruebas de diagnóstico apropiadas. Por ejemplo, junto a la indicación negativa es una matriz que tiene reactivos de prueba de diagnóstico que reaccionan con todas las muestras de orina, independientemente del contenido de los biomarcadores de apendicitis como se revela en este documento. Junto a la indicación positiva está una matriz que tiene reactivos de prueba de diagnóstico que reaccionan solamente con muestras que tienen la presencia del biomarcador de apendicitis de prueba, (por ejemplo, LRG, o cualquier o cualquier combinación de los biomarcadores de apendicitis enumerados en la Tabla 1) por encima de un nivel predefinido. Dicho dispositivo, tal como se discute en la figura 12, no requiere un gráfico, tal como un gráfico de coloración, para interpretar los resultados. Esto puede permitir que el dispositivo de detección, tal como un dispositivo de varilla indicadora (y el método correspondiente) para ser utilizado fácilmente por alguien sin formación especial y proporciona un diagnóstico más rápido (y método) para determinar si un sujeto es probable que tenga apendicitis aguda. Dicho dispositivo es ideal para la aplicación de pruebas en el punto de atención.

La producción y fabricante de las varillas indicadoras son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Las varillas indicadoras están disponibles comercialmente de Bayer Corporation of Elkhart, Ind., así como otras fuentes comerciales. La varilla indicadora se sumerge en una muestra de orina bien mezclada, y después de un período de tiempo, por ejemplo, entre unos treinta segundos (30s) a aproximadamente dos minutos (2 minutos) o más, las diversas bandas de reactivos se examinan visualmente u ópticamente los cambios de color. Las bandas se pueden comparar visualmente con una carta de colores preimpresos con el fin de determinar la cantidad de cada uno de los componentes o parámetros que se miden. También es posible escanear ópticamente utilizando una máquina o un escáner óptico la varilla indicadora y de ese modo obtener lecturas de los instrumentos de la intensidad del color o longitud de onda mediante el uso de un instrumento en particular adaptado para la lectura de los reactivos y el color de la varilla indicadora. Ejemplos de tales instrumentos o máquinas se fabrican por Ames. Ejemplos de máquinas o instrumentos útiles para explorar ópticamente las bandas de la varilla indicadora son capaces de distinguir entre las bandas de reacción o reactivos positivos y negativos, fue conveniente como diferencias en la distribución del color de las bandas de reactivo en la presencia (i.e., por encima de un cierto nivel umbral) o ausencia (o por debajo de un cierto nivel umbral) del(los) biomarcador(es) de apendicitis de prueba. El instrumento puede ser capaz de cuantificar una serie de bandas de reactivos, así como cuantificar la intensidad de color en general detectada en la banda.

Los inmunoensayos pueden operar sobre una base puramente cualitativa. Sin embargo, es posible medir la intensidad de la línea de ensayo para determinar la cantidad de antígeno en la muestra cuando se utiliza un inmunoensayo de dicho LFIA. La implementación de un inmunoensayo magnético (MIA) en la forma de ensayo de flujo lateral también permite la obtención de un resultado cuantificado.

Se han desarrollado instrumentos, que tanto determinan los componentes químicos de la orina y también ayudan en el análisis microscópico, por ejemplo, el instrumento revelado en la Patente de los Estados Unidos 6,004,821. Dicho instrumento es el IRIS Amarillo, que automáticamente coloca la muestra sobre la varilla indicadora de orina y luego lee los resultados químicos. La fig. 8 de la Patente de los Estados Unidos 6,004,821 muestra una representación esquemática de dicho conjunto de instrumento microscópico calorimétrico automatizado (que se indican generalmente por el número 54), y que se puede utilizar para escanear una muestra de orina, y puede, sin intervención humana significativa, analizar coloriméricamente las longitudes de onda de los colores impartidos a la varilla indicadora por la orina en la cámara 14, ya sea coloriméricamente y/o morfométricamente. De acuerdo con lo anterior, dicho instrumento, que está adaptado específicamente para escanear la reacción de la varilla indicadora después del contacto con una muestra de orina para la presencia de los biomarcadores de apendicitis (tales como al menos uno seleccionado de la Tabla 1) se abarca para uso en la presente invención.

La varilla indicadora puede utilizar reactivos tales como complejos de cobre–creatinina y de hierro–creatinina que tienen actividad peroxidasa. Otros reactivos de varilla indicadora pueden utilizar reactivos tales como 3,3',5, 5' tetrametilbencidina (TMB), y diisopropil dihidroperóxido benceno (DBDH) que se utilizan con peroxidasa. Una de varilla indicadora de usar para detectar la presencia de biomarcadores de apendicitis puede estar basada en los dispositivos de primera generación que dependían de la misma reacción colorimétrica utilizado para evaluar la presencia de las tiras de ensayo de glucosa en la orina. Además de la glucosa oxidasa, un kit de ensayo para su uso en este documento puede contener un derivado de bencidina, que se oxida a un polímero azul por el peróxido de hidrógeno formado en la reacción de oxidación. Se debe tener cuidado si se genera una varilla indicadora que garantice la tira de ensayo se desarrolla después de un intervalo preciso, después del contacto con la muestra de análisis de orina, así como una calibración frecuente del medidor para leer el resultado de la prueba. El mismo principio se utiliza en tiras de ensayo que han sido comercializados para la detección de cetoacidosis diabética (DKA). Estas tiras de ensayo usan una enzima beta–hidroxibutirato–deshidrogenasa en lugar de una enzima oxidante de la glucosa y se han utilizado para detectar y ayudar a tratar algunas de las complicaciones que pueden resultar de la hiperglucemia prolongada. Se han desarrollado los sensores de alcohol en la sangre utilizando el mismo enfoque, pero con enzimas de deshidrogenasa de alcohol.

El dispositivo, tal como un dispositivo de varilla indicadora, puede utilizar un método electroquímico. Las tiras de ensayo contienen un capilar que absorbe una cantidad reproducible de la orina. La presencia de un biomarcador de apendicitis tal como cualquiera o una combinación de los enumerados en la Tabla 1, en la orina reacciona con un electrodo de enzima que contiene agentes de unión de proteínas con el biomarcador de apendicitis de prueba. El método coulométrico es una técnica donde la cantidad total de carga generada por la unión específica del biomarcador de apendicitis a la reacción específica agente de unión de proteína se mide durante un período de tiempo. Esto es análogo a lanzar una pelota y medir la distancia que ha cubierto con el fin de determinar lo difícil que fue expulsado. El método amperométrico es utilizado por algunos metros y mide la corriente eléctrica generada en un punto específico en el tiempo. Esto es análogo a lanzar una pelota y el uso de la velocidad a la que está viajando en un punto en el tiempo para estimar lo difícil que fue arrojado. El método coulométrico puede permitir tiempos de ensayo variables, mientras que el tiempo de ensayo en un medidor mediante el método amperométrico siempre es fijo. Ambos métodos dan una estimación de la concentración del biomarcador de apendicitis en la muestra de orina.

Los niveles de proteínas biomarcadoras de apendicitis en orina se pueden detectar mediante un inmunoensayo magnético (MIA). MIA es un tipo de inmunoensayo de diagnóstico utilizando perlas magnéticas como marcadores en lugar de enzimas convencionales (ELISA), radioisótopos (RIA) o unidades estructurales fluorescentes (inmunoensayos fluorescentes). Este ensayo implica la unión específica de un agente de unión de proteína a una proteína biomarcadora de apendicitis, tales como una unión de anticuerpo con su antígeno, donde un marcador magnético se conjuga con un elemento del par. A continuación, la presencia de perlas magnéticas se detecta por un lector magnético (magnetómetro), que mide el cambio de campo magnético inducido por las perlas. La señal medida por el magnetómetro es proporcional a la cantidad de antígeno o biomarcador en la muestra inicial.

Las perlas magnéticas están hechas de partículas de óxido de hierro de tamaño nanométrico encapsulados o pegadas entre sí con polímeros. Estas perlas magnéticas pueden variar desde 35 nm hasta 4.5 μm . Las nanopartículas magnéticas de componentes van de 5 a 50 nm y muestran una calidad única denominada como superparamagnetismo en presencia de un campo magnético aplicado externamente. Los marcadores magnéticos muestran varias características muy bien adaptadas para dichas aplicaciones: no se ven afectados por la química Regente o foto–blanqueo y, por lo tanto, son estables en el tiempo; el trasfondo magnético en una muestra biomolecular es generalmente insignificante; turbidez de la muestra o tinción no tienen ningún impacto en las propiedades magnéticas; y perlas magnéticas pueden ser manipulados de forma remota por el magnetismo.

El uso de MIA es bien conocido en la técnica, por ejemplo, Dittmer WU and colleagues (J Immunol Methods. 2008, 338:40–6) describen un inmunoensayo sensible y rápido para la detección y medición de la hormona paratiroidea utilizando marcadores de partículas magnéticas y el accionamiento magnético. El ensayo consiste en un inmunoensayo sándwich de 1 etapa, sin etapas de reposición de líquidos. El límite de detección es del orden de 10 pM y el ensayo se llevó a sólo 15 minutos; Kuma H and collages (Rinsho Byori. 2007, 55:351–7) desarrollaron un sistema de

inmunoensayo sensible utilizando nanopartículas magnéticas hechas de Fe_3O_4 ; y Kuramitz H. revisa el estado actual de la relación con los inmunoensayos electroquímicos utilizando microperlas magnéticas como una fase sólida en Anal Bioanal Chem. 2009, 394:61–9. Patente de los Estados Unidos No. 5,252,493; 5,238,811; 5,236,824; 7,604,956; U. S. Patent Application No. 20090216082; 20090181359; y 20090263834 todos describen diversas mejoras y versiones de MIA.

Los magnetómetros son instrumentos que pueden detectar la presencia y medir la señal magnética total de una muestra. Un MIA eficaz es el que es capaz de separar fondo magnético (ruido) de origen natural de la diana (señal) marcada magnéticamente débil. Diversos enfoques y dispositivos se han empleado para lograr una significativa relación de señal a ruido (SNR) para aplicaciones de biodetección: sensores magnetoresistentes gigantes y válvulas de espín, voladizos piezorresistivos, sensores inductivos, dispositivos de interferencia cuántica superconductores, anillos magnetoresistentes anisotrópicos, y sensores Hall en miniatura. MIA que explota las propiedades magnéticas no lineales de marcadores magnéticos puede utilizar eficazmente la capacidad intrínseca de un campo magnético para pasar a través de plástico, agua, nitrocelulosa, y otros materiales, lo que permite mediciones volumétricas verdaderas en diversos formatos de inmunoensayo. A diferencia de los métodos convencionales que miden la susceptibilidad de los materiales superparamagnéticos, un MIA basado en la magnetización no lineal elimina el impacto de los materiales dia o paramagnéticos lineales, tales como matriz de la muestra, plástico consumible y/o nitrocelulosa. Aunque el magnetismo intrínseco de estos materiales es muy débil, con valores de susceptibilidad típicos de $-10 - 5$ (dia) o $+ 10-3$ (para), cuando se está investigando cantidades muy pequeñas de materiales superparamagnéticos, tales como nanogramos por prueba, la señal de fondo generada por los materiales auxiliares no se puede ignorar. En MIA basado en las propiedades magnéticas no lineales de marcadores magnéticos las perlas están expuestas a un campo magnético alterno a dos frecuencias, f_1 y f_2 . En la presencia de materiales no lineales tales como marcadores superparamagnéticos, una señal se puede grabar en las frecuencias combinatorias, por ejemplo, en $f = f_1 \pm 2Xf_2$. Esta señal es exactamente proporcional a la cantidad de material magnético dentro de la bobina de lectura. El biosensor magnético ultrasensible para inmunoensayo homogéneo se han descrito por Y. R. Chemla, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000, 97:14268–14272.

Los niveles de proteínas biomarcadoras en la orina se pueden detectar mediante un inmunoensayo de difusión (DIA). En este ensayo, el transporte de moléculas perpendicular para fluir en un microcanal, por ejemplo, en un chip microfluídico, se ve afectado por la unión entre antígenos y anticuerpos. Mediante formación de imágenes de la posición de estado estacionario de los componentes marcados en una corriente que fluye, la concentración de analitos muy diluidos, en esta invención, los biomarcadores de orina, se pueden medir en unos pocos microlitros de muestra en segundos. La microfluídica es la manipulación de volúmenes de microlitros en canales con dimensiones submilimétricas. Los inmunoensayos de difusión microfluídicos para la detección de analitos o biomarcadores en muestras de fluidos se han descrito en la técnica, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,541,213; 6,949 377; 7,271,007; la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 20090194707; 20090181411; en Hatch et al., 2001, Nature Biotechnology 19(5): 461–465; K. Scott Phillips and Quan Cheng, Anal. Chem., 2005, 77:327–334; J. Hsieh, et al., Nanotech 2007 Vol. 3, Technical Proceedings of the 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show, Chapter 4: Micro and Nano Fluidics, pp292–295; Frank Y. H. Lin et al., Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2005, 12:418–425; y A. Bhattacharyya and C. M. Klapperich, 2007, Biomedical Microdevices, 9: 245–251. La Patente de los Estados Unidos No. 6,541,213 describe el uso de un dispositivo microfluídico de tamaño de tarjetas de crédito para realizar inmunoensayos competitivos. La capacidad de realizar ensayos en esta dimensión microescala proporciona una alternativa extremadamente rápida y homogénea, y económica de los métodos actuales utilizados comercialmente en la actualidad. El dispositivo microfluídico de tamaño de tarjetas de crédito se puede integrar en el desarrollo de sistemas de punto de uso que permiten respuestas en tiempo real a las preguntas de salud, mientras que, en el consultorio del médico, hogar, lugar de trabajo, escuela, centro comercial y otros lugares públicos. Estos sistemas incluyen instrumentos portátiles y de mano con pruebas de laboratorio integrada en una tarjeta ("cartas de laboratorio"), así como tarjetas de laboratorio, desechables, autónomas, que se desarrollan para proporcionar resultados rápidos in situ en las pruebas de enfermedades infecciosas, prueba del ácido nucleico, análisis del tipo de sangre, pruebas de cáncer y pruebas de enfermedades respiratorias.

Los niveles de proteínas biomarcadoras en la orina pueden ser detectados por un ensayo sobre el terreno también conocido como ensayo en el punto de atención. Los ensayos en el punto de atención (POCT) se define como pruebas de diagnóstico en o cerca del sitio de la atención al paciente. Actualmente la mayoría de las pruebas de detección y diagnóstico para analitos, toxina, toxinas y antígenos de patógenos en las muestras se limita en gran medida a los laboratorios centralizados debido a la necesidad de largos tiempos de ensayo, equipo complejo y costoso, y técnicos altamente capacitados. POCT lleva la prueba convenientemente y de inmediato para el paciente. Esto aumenta la probabilidad de que el paciente recibirá los resultados de una manera oportuna. POCT se logra mediante el uso de instrumentos transportables, portátiles y de mano (por ejemplo, un medidor de glucosa en la sangre, el dispositivo de estudio de conducción nerviosa) y kits de ensayo (por ejemplo, CRP, HBA1C, Homocisteína, ensayo salival de VIH, etc.). Los POCT son bien conocidos en la técnica, especialmente inmunoensayos. Por ejemplo, la tira de ensayo LFIA o varillas indicadoras, fácilmente se pueden integrar en un kit de diagnóstico POCT. Un experto en el arte será capaz de modificar inmunoensayos para POCT utilizando formato diferente, por ejemplo, ELISA en un formato de dispositivo de

- microfluidos o un formato de tira de ensayo. Por ejemplo, la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No.2009/0181411 describe un inmunoensayo en el punto de atención basado en un dispositivo microfluídico para moléculas de biomarcadores asociadas con la patología en un huésped vertebrado, hombre o animal. Los microfluidos débiles, tales como chips están formateados ya sea a cartuchos portátiles (también denominadas "tarjetas"), o cartuchos para las pruebas automatizada o semiautomatizada, asistidas con máquina. Los ensayos basados en dispositivos de microfluidos permiten el muestreo de pequeño volumen, con resultados en el punto de atención a partir de una amplia variedad de fluidos biológicos y muestras en tiempo real. Además, los cartuchos de ensayo pueden ser paquetes de reactivo desechables, o ser totalmente autónomos y que pueden funcionar totalmente a mano.
- 5
- También se describen kits de diagnóstico y productos de fabricación que comprenden los kits de diagnóstico. Los kits pueden comprender un medio para predecir la apendicitis aguda en un ser humano.
- 10
- El kit puede comprender un indicador que responde al nivel de proteína biomarcadora en una muestra de orina, en donde la proteína biomarcadora de apendicitis se selecciona del grupo que consiste en LRG, S100– A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3. El indicador puede estar en la forma de una tira de ensayo LFIA o un dispositivo de microfluidos. Un kit de diagnóstico puede comprender múltiples tiras de ensayo LFIA, una tira para una proteína biomarcadora diferente. Un kit de diagnóstico puede comprender una única tira de ensayo LFIA compuesta para determinar los niveles de varias proteínas biomarcadoras. Un kit de diagnóstico puede comprender un dispositivo de microfluidos multicanal único para determinar los niveles de varias proteínas biomarcadoras. Un kit de diagnóstico puede comprimir diversos dispositivos de microfluidos para determinar los niveles de varias proteínas biomarcadoras, un dispositivo de microfluidos para una proteína diferente de biomarcadores.
- 15
- Los kits pueden comprender, además, tazas o tubos, o cualquier otro dispositivo de recogida para la recogida de muestras de orina.
- 20
- El kit puede comprender además opcionalmente al menos un diagrama y/o instrucciones que describen la interpretación de los resultados de las pruebas.
- Agentes de unión de proteínas, anticuerpos o antisueros contra proteínas biomarcadoras
- 25
- Los métodos descritos en este documento pueden utilizar anticuerpos o anti–sueros para detectar, cuantificar, y/o marcar LRG, S100–A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3 descritos en este documento. Los anticuerpos se pueden obtener de una fuente comercial. Estos anticuerpos comerciales también se pueden conjugar con marcadores, por ejemplo, Cy 3 o FITC.
- Los anticuerpos para uso en los métodos descritos en este documento también se pueden producir utilizando métodos estándar para producir anticuerpos, por ejemplo, mediante la producción de anticuerpos monoclonal (Campbell, A.M., Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands (1984); St. Groth et al., J. Immunology, (1990) 35: 1–21; y Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72). Los anticuerpos también se pueden obtener fácilmente mediante el uso de porciones antigénicas de la proteína para seleccionar una biblioteca de anticuerpo, tal como una biblioteca de expresión en fagos por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5,702,892 (U.S.A. Health & Human Services) y WO 01/18058 (Novopharm Biotech Inc.) revelan bibliotecas de expresión en bacteriófagos y métodos de selección para producir fragmentos de los dominios de unión de anticuerpo.
- 30
- Los métodos para la producción de anticuerpos se revelan en la publicación PCT WO 97/40072 o la Solicitud de los Estados Unidos No. 2002/0182702. Los procesos de inmunización para provocar la producción de anticuerpos en un mamífero, la generación de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales, y la purificación de anticuerpos pueden ser realizados por lo descrito en "Currante Protocols in Immunology" (CPI) (John Wiley and Sons, Inc.) y Antibodies: A Laboratory Manual (Ed Harlow and David Lane editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988); Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", in BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY 227–49, Pezzuto et al. (eds.) (Chapman & Hall 1993).
- 35
- Por ejemplo, para generar un anticuerpo policlonal contra LRG humano, S100– A8, ORM1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD o SERPINA3. Los métodos de fabricación de proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, ADNc de longitud completa de LRG, S100– A8, ORM 1, PLG, MASP2, AZGP1, ApoD y SERPINA3 (Nos. de Acceso Genbank NM_052972.2, NM_002964.3, NM_000607.2, NM_000301.2, NM_006610.2, NM_001185.2, NM_001647.3, y NM_001085.4 respectivamente) se puede clonar en el vector pQE30 que contiene una etiqueta de hexa–histidina N–terminal (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemania), y después se transformaron en células E. coli de la cepa JM109. Las proteínas recombinantes se expresan y purifican por cromatografía de afinidad utilizando agarosa ácida Ni–nitriloacético (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La preparación final produjo un solo peso molecular calculado de banda de 89707 kDa en SDS–PAGE y se utiliza para la inmunización de conejos.
- 40
- 45
- 50

La detección de anti-anticuerpos para los biomarcadores de apendicitis se puede lograr mediante marcación directa de los propios anticuerpos, con marcadores que incluyen un marcador radiactivo tal como ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , o ^{131}I , un marcador fluorescente (por ejemplo, Cy3, Cy5, FITC), un marcador hapteno tal como biotina, metal pesado tal como oro, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo primario no marcado se utiliza en conjunción con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. El anticuerpo primario o antisueros pueden estar sin marcar, los antisueros secundario o anticuerpo se pueden conjugar con biotina y estreptavidina ligado a enzimas se pueden usar para producir la tinción visible para análisis histoquímico.

Los niveles de las proteínas biomarcadoras de apendicitis descritos en este documento en una muestra se pueden determinar mediante espectrometría de masas tales como MALDI/TOF (tiempo de vuelo), SELDI/TOF, espectrometría de cromatografía de masa líquida (LC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear, o espectrometría de masas en tándem (por ejemplo, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, etc.). Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos: 20030199001, 20030134304, 20030077616.

Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica y se han utilizado para cuantificar y/o identificar biomoléculas, tales como proteínas (véase, por ejemplo, Li et al. (2000) *Tibtech* 18:151-160; Rowley et al. (2000) *Methods* 20: 383-397; y Kuster and Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8: 393-400). Además, se han desarrollado técnicas de espectrometría de masas que permiten al menos parcial, la secuenciación de novo de proteínas aisladas. Chait et al., *Science* 262:89-92 (1993); Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7131-6 (1999); revisado en Bergman, *EXS* 88:133-44 (2000).

Un espectrofotómetro de iones en fase gaseosa puede ser utilizado. Alternativamente, se puede utilizar espectrometría de masas láser de desorción/ionización, para analizar la muestra. Espectrometría de masas láser de ionización/desorción ("LDI-MS") puede ser practicada en dos variantes principales: espectrometría de masas láser asistida por matriz de desorción/ionización ("MALDI") y láser mejorada en superficie de desorción/ionización ("SELDI"). En MALDI, el analito se mezcla con una solución que contiene una matriz, y una gota de líquido se coloca en la superficie de un sustrato. La solución matriz entonces cocrystaliza con las moléculas biológicas. El sustrato se introduce en el espectrómetro de masas. La energía láser se dirige a la superficie del sustrato donde desorbe e ioniza las moléculas biológicas sin fragmentarlas significativamente. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,118,937 (Hillenkamp et al.), y la Patente de los Estados Unidos No. 5,045,694 (Beavis & Chait).

En SELDI, la superficie del sustrato se modifica para que sea un participante activo en el proceso de desorción. En la variante, la superficie forma un derivado con adsorbente y/o reactivos de captura que se unen selectivamente la proteína de interés. En otra variante, la superficie forma un derivado con moléculas que absorben la energía que no se desorbe cuando se golpea con el láser. En otra variante, la superficie forma un derivado con moléculas que unen la proteína de interés y que contienen un enlace fotolítico que se rompe después de la aplicación del láser. En cada uno de estos métodos, el agente de formación de derivados generalmente se localiza en una ubicación específica en la superficie del sustrato, donde se aplica la muestra. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,719,060 y WO 98/59361. Los dos métodos se pueden combinar, por ejemplo, utilizando una superficie de afinidad SELDI para capturar un analito y la adición de líquido que contiene la matriz con el analito capturado para proporcionar el material de absorción de energía.

Para obtener información adicional con respecto a los espectrómetros de masas, véase, por ejemplo, *Principles of Instrumental Analysis*, 3rd. edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; y Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4.sup.th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), pp. 1071-1094.

La detección y cuantificación de proteínas biomarcadoras de apendicitis por lo general dependerá de la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y el carácter de un polipéptido unido al sustrato. Por ejemplo, la potencia de la señal de los valores máximos de los espectros de una primera muestra y una segunda muestra se puede comparar (por ejemplo, visualmente, mediante análisis de ordenador, etc.), para determinar las cantidades relativas de biomoléculas particulares. Se pueden utilizar programas de software tales como el programa WIZARD de biomarcador de apendicitis (CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, Calif.) para ayudar en el análisis de los espectros de masas. Los espectrómetros de masas y sus técnicas son bien conocidas para los expertos en arte.

Formación de imágenes de diagnóstico de apendicitis aguda

Se describe en este documento un método para diagnosticar la probabilidad de apendicitis aguda en un sujeto *in situ* mediante la formación de imágenes histoquímicas de un apéndice utilizando al menos un agente de unión de proteína que unen específicamente a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en α -2-glucoproteína rica en leucina

(LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); y α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).

5 El método puede comprender además al menos un agente de unión de proteína adicional diferente que se une específicamente a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD 14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de inter- α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor del ácido hialuronano vascular linfático 1; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No. de acceso: IPI00550644); proteína de interacción PDZK1 1; PRIC285; prostaglandina H2-D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS 1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VAOD1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; y β -1,3-galactosiltransferasa.
10 El método puede comprender además al menos un agente de unión de proteína diferente adicional que se une específicamente a un biomarcador seleccionado de la Tabla 1.

15 El método para diagnosticar la probabilidad de apendicitis aguda en un sujeto puede comprender (a) introducir un agente de unión de proteína en el sujeto a través de un vehículo fisiológicamente compatible en una cantidad eficaz para la detección, en donde el agente de unión de proteína marcado de forma detectable; (b) detectar la localización del agente de unión de proteína en el apéndice con un medio de detección extracorpóreo capaz de detectar el medio de marcación; y (c) cuantificar la concentración de agente de unión de proteína con el fin de determinar la presencia y la extensión de la inflamación en el apéndice. La intensidad del marcador puede ser directamente proporcional a la
20 concentración del agente de unión de proteína que se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis.

La concentración de agente de unión de proteína medida por un medio de detección extracorpóreo en un paciente se puede comparar con la concentración del agente de unión de proteína en un individuo sano, en donde el marcador detectable y el método de formación de imágenes son los mismos tanto para el paciente como para los individuos sanos. El paciente puede tener al menos un síntoma asociado con apendicitis aguda, como se revela en este
25 documento o como se conoce por un experto en el arte, tal como un médico. La concentración del agente de unión de proteína en el apéndice de un paciente se puede comparar con la concentración del agente de unión de proteínas que es el promedio obtenido para una población, i. e. más de dos individuos, preferiblemente diez o más, de individuos sanos, en donde el marcador detectable y el método de formación de imágenes son los mismos tanto para el paciente como para el individuo sano.

30 El agente de unión de proteína puede ser introducido en el sistema vascular del sujeto, por ejemplo, por vía intravenosa. El agente de unión de proteína puede ser introducido en la cavidad abdominal del sujeto, de preferencia dentro de la vecindad del apéndice en el abdomen inferior derecho. El agente de unión de proteína puede ser introducido en la cavidad peritoneal, preferentemente dentro de la vecindad del apéndice en el abdomen inferior derecho.

Una cantidad fija de tiempo se puede dejar para que tenga efecto antes de realizar la imagen.

35 El agente de unión de proteína puede ser un anticuerpo o fragmento del mismo. El agente de unión de proteína puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo. El agente de unión de proteína puede ser un anticuerpo policlonal o fragmento activo del mismo. Por ejemplo, el agente de unión de proteína puede ser un anticuerpo anti-LRG o fragmentos del mismo. El agente de unión de proteína puede ser un anticuerpo que es específicamente inmunorreactivo (i. e. une específicamente a) a una proteína biomarcadora seleccionada del grupo que consiste en α -
40 2-glucoproteína rica en leucina (LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3); AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de inter- α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1
45 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción PDZK1 1; PRIC285; prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS 1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VAOD1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; β -1,3-galactosiltransferasa y un biomarcador seleccionado de la Tabla 1.

50 El agente de unión de proteína se puede conjugar con un marcador para la detección extracorpórea del agente de unión de proteína situado en el cuerpo del sujeto.

El marcador detectable en el agente de unión de proteína puede ser seleccionado del grupo que comprende de radioisótopos, marcadores paramagnéticos, liposomas ecogénicos, biotina, y fluorescencia.

- 5 El método de detección extracorpórea se puede seleccionar del grupo que comprende imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía axial computarizada (TAC), exploración de tomografía por emisión de positrones (PET), haces de electrones, exploración de tomografía computarizada (CT), formación de imágenes de tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes gamma, angiografía, ecografía abdominal, y detección radiactiva y fluorescente abdominal.
- Los radionúclidos pueden ser utilizados como los medios de marcación y la etapa de detección de la localización del agente de unión de la proteína dentro del sujeto puede incluir además la detección de radiación de la misma con un detector de radiación. Un radionúclido puede ser el marcador detectable conjugado con el agente de unión de proteína.
- 10 La etapa de detección de la radiación puede incluir además el empleo de una cámara de rayos gamma para detectar y hacer una imagen de la radiación gamma emitida por los medios de marcación del reactivo de unión a proteínas.
- 15 Los radionúclidos apropiados incluyen Co-57, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-113m, I-123, I-125, I-131, Hg-197, Au-198, y Pb-203. Los radionúclidos se pueden unir mediante marcación directa (por ejemplo, por reacciones reguladas ácidas o procedimientos oxidativos) o por intercambio de ligando o quelación. Los radionúclidos son imágenes preferiblemente con un medio de detección de radiación capaz de detectar radiación gamma, tales como una cámara gamma o similares. Los métodos de radiomarcación de proteínas para la formación de imágenes son bien conocidos para un experto en el arte, por ejemplo, D. Hnatowich, et al., 1983, Science 220:613-615; M. R. McDevitt, et al., 2000, Cancer Res. 60:6095-6100; DA Scheinberg, et al., 1982, Science, 215:1511-1513; y W. J. McBride, et al., 2009, J. Nucl. Med. 50, 991-998; y R. Macklis, B. et al., 1988, Science 240:1024-1026; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,472,509; 4,454,106; 4,634,586; 4,994,560; 5,286,850; Solicitud de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 2008/0241967 y 20090297620.
- 20 Por lo general, las cámaras de imagen de radiación emplean un medio de conversión (en donde se absorbe el rayo gamma de alta energía, desplazando un electrón que emite un fotón a partir de su retorno al estado orbital), detectores fotoeléctricos dispuestos en una cámara de detección espacial (para determinar la posición de los fotones emitidos), y sistemas de circuitos eléctricos para analizar los fotones detectados en la cámara y producir una imagen.
- 25 La invención también puede ponerse en práctica con medios de marcación no radiactivos, tales como agentes el contraste magnético capaces de detección en los sistemas de formación de imágenes de resonancia magnética (MRI). En tales sistemas, se utiliza un fuerte campo magnético para alinear los vectores de espín nuclear de los átomos en el cuerpo de un paciente. El campo entonces es perturbado y una imagen de la patente se lee como los núcleos vuelvan a sus alineaciones de equilibrio. El agente de unión de proteína puede estar unido a agentes de contraste diamagnéticos, tales como complejos de gadolinio, cobalto, níquel, manganeso o cobre, para formar los reactivos de diagnóstico conjugados que se forman imágenes de forma extracorpórea con un sistema de MRI. Otras técnicas de formación de imágenes incluyen la pletismografía, termografía y exploración ultrasónica
- 30 El agente de unión de proteína tal como un anticuerpo puede ser genética o químicamente modificado para contener sitios de unión ^{99m}Tc para formación de imágenes por gammagrafía nuclear. La formación de imágenes cuantitativa localizada se realiza *in vivo* (formación de imágenes SPECT) se puede llevar a cabo sobre el sujeto.
- 35 El agente de unión de proteína se puede marcar con gadolinio o liposomas ecogénicas para resonancia magnética y la formación de imágenes de ultrasonido del abdomen, respectivamente.
- Los métodos y reactivos tales como anticuerpos marcados de forma detectable para la formación de imágenes *in situ* se han descrito y son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nos. 3,899,675; 4,660,563; 4,877,599; 4,647,445; 5,605,831; 6,716,410; Solicitud de la Patente de los Estados Unidos Nos. 2009/0016965 y 20070059775. Los métodos y reactivos adicionales para la formación de imágenes *in situ* se describen en JH Tseng, 2001, Abdominal Imaging, 26: 171-177; Liu, Qing-Yu, 2009, Abdominal Imaging, in press; DA Scheinberg, et al., 1982, Science, 215:1511-1513; y W. J. McBride, et al., 2009, J. Nucl. Med. 50, 991-998.
- 40 Conjugación del agente de unión de proteína, por ejemplo, anticuerpo a los liposomas ecogénicas para formación de imágenes de ultrasonido
- 45 Los liposomas ecogénicos conjugados con anticuerpo han sido desarrollados para mejorar la imagen intravascular específica de sitio (30 MHz) y transvascular (15 MHz). Como ejemplos, los anticuerpos de molécula de adhesión-1 antifibrinógenos y antiintercelular (anti-ICAM-1) se han conjugado con los liposomas acústicamente reflectantes y las imágenes obtenidas en modelos animales de trombos y lesiones ateroscleróticas. Estos liposomas acústicos constan de una mezcla molar 60:8:2:30 de fosfatidilcolina:fosfatidil-etanolamina:fosfatidilglicerol:colesterol y son preparados por una mezcla de deshidratación/rehidratación. Son multilaminares con bicapas lipídicas bien separadas y vesículas internas que confiere ecogenicidad. Su tamaño medio es de ~800 nm, medido por dispersión de luz casi elástica. Estos liposomas son estables en la circulación, no lo hacen atrapar el gas, pasan a través de los capilares pulmonares y
- 50

retener sus propiedades a 37°C., incluso después de la conjugación con anticuerpos. Los anticuerpos se modifican mediante la adición de cisteínas a la Cor N-terminal de la proteína y conjugados a liposomas. Un catéter de formación de imágenes de 12 MHz (Acuson) se utiliza para la formación de imágenes (resolución <1 mm). Los anticuerpos son tiolados con propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio), reducido, y conjugado con los liposomas mediante la creación de un enlace tioéter entre el anticuerpo y fosfolípido. Los anticuerpos conjugados son estables y tienen una larga vida media de estante. La formación de imágenes es por ultrasonido.

Agente de unión de proteína marcado con gadolinio (Gd3), por ejemplo, anticuerpos scFv (MAbs)

Un método de formación de imágenes alternativo que proporciona una resolución mejorada (<0.5 mm), formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) es el uso de agente de unión de proteína marcado con Gd3 como un agente de contraste. MRI tiene la ventaja de adquisición rápida, aumento de resolución, y ausencia de radiactividad. Sin embargo, debido a que Gd3 libre como un agente de contraste es tóxico, se usa en formación de imágenes MRI clínica unida a ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Existe precedente para conjugar Gd3 con MAbs por reacción de ácido cíclico-diaminatriaminopentaacético anhídrido (c-DTPA) con los anticuerpos conjugados MAb.Polilisina-DTPA-Gd3 se han utilizado para obtener imágenes de tumor con hasta 30 iones GD3 conjugadas sin afectar significativamente a la afinidad del antígeno. Estudios anteriores utilizando MAbs marcado con Gd3 tienen ya sea Gd3 unido directamente con grupos NH₂ disponibles o polilisina conjugada químicamente. El sitio natural para el acoplamiento de DTPA se limita en moléculas scFv (anticuerpo de cadena sencilla). Por lo tanto, se puede utilizar la fusión genética de los diversos grupos de grupos de polilisina (6-30 de longitud) con la N-terminal o C-terminal de scFv MAb y esta fusión se puede hacer reaccionar con c-DTPA. Aunque otros grupos amino pueden reaccionar potencialmente, la disponibilidad de polilisina en la cola de la molécula debe permitir la marcación de sitio dirigido preferencial. La bioingeniería del sitio de polilisina hecho por la PCR utilizando los cebadores de codificación de seis residuos de lisina y sitios de restricción para la clonación en ambos extremos 5' y 3'.

Formación de imágenes con el agente de unión de proteína marcado con ^{99m}Tc, por ejemplo, anticuerpo

La marcación con ^{99m}Tc de anticuerpos de oxidación específicos se ha descrito previamente (Tsimikas et al., 1999, J Nucl Cardiol. 1999;6:41-53). El agente de unión de ^{99m}Tc-proteína específico para los biomarcadores descritos en este documento puede ser inyectado por vía intravenosa en el paciente y se analiza para la farmacocinética, la distribución en los órganos y la absorción de apéndice. Para la formación de imágenes *in vivo*, se inyectan 1-5 mCi por vía intravenosa en el paciente y la formación de imágenes se puede llevar a cabo con un detector dual ADAC vertex modelo gamma camera se establece en una ventana de 20% para ^{99m}Tc (colimador VXUR) equipado con el software de ordenador ADAC Pegasys™. Las imágenes planas *in vivo* (anterior, posterior y posiciones oblicuas 45°) y SPECT pueden ser adquiridos en una matriz 256x256x12 durante un mínimo de 1x10⁶ recuentos a los 10 minutos después de la inyección. La formación de imágenes de repetición se puede realizar para 3-500,000 recuentos en diversos puntos de tiempo sobre la base del objetivo óptimo a la proporción de fondo derivada de los datos de absorción *in vivo*. Los estudios de formación de imagen anteriores utilizando anticuerpo monoclonal entero han demostrado que el anticuerpo monoclonal entero a menudo dan una baja relación señal a ruido debido a la prolongada vida media del ^{99m}Tc-MAb en la circulación. El uso de Fab, scFv, o fragmentos más pequeños puede derogar este problema en determinadas condiciones de formación de imágenes como los Fab y scFv tienen unas vidas medias muy cortas (<30 minutos). Cuando la relación señal a ruido no es favorable, las inyecciones de MDA-LDL, Cu-OxLDL, u otro antígeno apropiado se pueden inyectar para borrar la señal de fondo.

Imagen con el agente de unión de proteína marcado con Gd3, por ejemplo, anticuerpo

La marcación de Gd3 con un complejo de anticuerpo-DTPA se ha descrito previamente (Lister-James, et al, 1996, J Nucl Med. 1996;40:221-233; Wu et al, 1995, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; 15:529-533). Las pruebas iniciales para ensayos de absorción *in vivo* se pueden llevar a cabo con 153 Gd-anticuerpo en ratones y conejos y se determina la farmacocinética, biodistribución y absorción de la placa aórtica del anticuerpo. La formación de imágenes *in vivo* se puede realizar en conejos con un escáner 1.5 T GE MRI con una pequeña bobina de superficie.

Sistemas informáticos y medios legibles por ordenador para ensayo de biomarcadores de apendicitis en muestras de orina.

También se describe un sistema para el análisis de una muestra biológica de orina de un sujeto, donde el sistema comprende: (a) un módulo de determinación configurado para recibir una muestra biológica de orina y para determinar una información del nivel de biomarcador de apendicitis, en donde la información del nivel de biomarcador de apendicitis comprende la determinación de al menos un nivel de biomarcador de apendicitis, i.e., en el nivel o cantidad de un biomarcador de apendicitis, tal como LRG, o cualquier o una combinación de biomarcadores de apendicitis enumerados en la Tabla 1; (b) una conexión desde el módulo de determinación para transmitir la información de nivel de biomarcador de apendicitis a un ordenador electrónico, en donde el ordenador comprende un dispositivo de almacenamiento, un módulo de comparación y un módulo de visualización; (c) el dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar

información del nivel de biomarcador de apendicitis del módulo de determinación; (d) el módulo de comparación adaptado para comparar la información del nivel de biomarcador de apendicitis almacenada en el dispositivo de almacenamiento con datos de referencia, y para proporcionar un resultado de la comparación, en donde el resultado de la comparación comprende; (i) una comparación del nivel de biomarcador de apendicitis en la muestra biológica de orina con el nivel de biomarcador de apendicitis de referencia, y (ii) una determinación del nivel de biomarcador de apendicitis en la muestra biológica por encima o por debajo de un nivel de umbral con respecto al nivel de biomarcadores de apendicitis, en donde un nivel de biomarcador de apendicitis por encima del nivel de umbral para ese biomarcador es indicativo de apendicitis aguda (i.e., un resultado de la prueba positivo); y en donde un nivel de biomarcador de apendicitis por debajo del nivel de umbral es indicativo de ausencia de la apendicitis aguda (i.e., un resultado de la prueba negativo); y (e) el módulo de pantalla para la visualización de un contenido basado en parte en el resultado de la comparación para el usuario, en donde el contenido es una señal indicativa de la probabilidad de un sujeto que tiene apendicitis aguda (i.e., un resultado de la prueba positivo) o poco probable que tenga apendicitis aguda (i.e., un resultado de la prueba negativo).

También se describe un medio legible por ordenador que tiene instrucciones legibles por ordenador grabado en el mismo para definir módulos de software que incluyen un módulo de comparación y un módulo de pantalla para implementar un método en un ordenador, el método que comprende: (a) la comparación con el módulo de comparación de los datos almacenados en un dispositivo de almacenamiento con datos de referencia para proporcionar un resultado de la comparación, en donde el resultado de comparación es la información de nivel de biomarcador de apendicitis en la orina biológica por encima de un nivel de umbral con respecto a un nivel de biomarcador de apendicitis de referencia para ese biomarcador probado que es indicativo de apendicitis aguda; y (b) visualizando un contenido basado en parte en el resultado de la comparación para el usuario, en donde el contenido es una señal indicativa de apendicitis aguda.

El nivel umbral de biomarcador de apendicitis que se utiliza en el sistema, medio legible por ordenador y métodos como se describe en este documento que es indicativo de apendicitis aguda puede estar a un nivel de al menos aproximadamente dos veces (2x) por encima del nivel de biomarcador de apendicitis de control o referencia para ese biomarcador. Por ejemplo, si el biomarcador de apendicitis es LRG, si el nivel de LRG en la muestra de orina de ensayo desde el sujeto es al menos aproximadamente 2 veces por encima del nivel de biomarcadores LRG referencia, es indicativo de un sujeto que pueda tener o estar en riesgo de apendicitis aguda. Un nivel umbral puede ser al menos aproximadamente 3 veces, o al menos aproximadamente 4 veces, o al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces, o al menos aproximadamente 8– veces, o al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más de 10 veces por encima del nivel de referencia para ese biomarcador, y por lo tanto un nivel del biomarcador de apendicitis en la muestra de orina de ensayo por encima del nivel umbral es indicativa de un sujeto que pueda tener o estar en riesgo de apendicitis aguda.

El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento se pueden utilizar para medir un nivel de biomarcador de apendicitis en una muestra biológica, donde el nivel de biomarcador de apendicitis es el nivel de un biomarcador polipéptido, por ejemplo, cualquier biomarcador de la Tabla 1 o de cualquier SEQ ID NOs 1–49. El nivel de al menos una proteína biomarcadora se puede medir mediante el inmunoensayo, por ejemplo análisis de Western blot o ELISA, o un método de detección de proteínas de alto flujo, por ejemplo, pero no se limitan a aparatos de inmunohistoquímica automatizados, por ejemplo, aparato de inmunohistoquímica robot automatizado que en una sección de sistema automatizado la muestra de tejido o de muestra biológica, se preparan portaobjetos, realizan el procedimiento de inmunohistoquímica y detectan la intensidad de inmunotinción, tal como la intensidad de una unión de anticuerpo con una proteína biomarcadora en la muestra de orina y producen datos de salida. Ejemplos de tales aparatos de inmunohistoquímica automatizados están comercialmente disponibles, por ejemplo, tal Autostainers 360, 480, 720 y máquinas módulo Labvision PT de LabVision Corporation, que se revelan en las Patentes de los Estados Unidos 7,435,383; 6,998,270; 6,746,851, 6,735,531; 6,349,264; y 5,839; 091. Otros instrumentos de inmunohistoquímica automatizados disponibles en el mercado también se incluyen para su uso en la presente invención, por ejemplo, pero no son limitan a BOND™ Automated Immunohisto chemistry & *In Situ* Hybridization System, Automatizar cargador de portaobjetos de la visión GTI. El análisis automatizado de la inmunohistoquímica se puede realizar por los sistemas disponibles comercialmente, tales como, por ejemplo, IHC anotador y ruta EX, que se pueden combinar con imágenes espectrales aplicadas (ASI) Cytolab vista, también disponible de visión GTI o Aplicada de imágenes espectrales (ASI) todas las cuales pueden ser integrados en los sistemas de intercambio de datos, tales como, por ejemplo, Laboratory Information System (LIS), que incorpora Picture Archive Communication System (PACS), también disponible de Applied Spectral Imaging (ASI) (véase world-wide-web: spectral-imaging.com). Otro un módulo de determinación puede ser un sistema de inmunohistoquímica automatizado tal como el sistema de tinción de portaobjetos NexES® inmunohistoquímica automatizada (IHC) o instrumento IHC automatizado BenchMark® LT de Ventana Descubrimiento SA, que se puede combinar con sistema de análisis de imagen VIAS™ también disponible de Ventana Discovery. Sistemas de detección BioGenex Super Sensitive MultiLink®, en cualquiera de los protocolos manuales o automatizados también pueden ser utilizados como el módulo de detección, preferiblemente utilizando los sistemas de tinción automatizados BioGenex. Tales sistemas se pueden combinar con un sistema de tinción automatizado BioGenex, i6000™ (y su predecesor, OptiMax® Plus), que está orientado para Clinical Diagnostics lab, y GenoMx 6000™, para

Drug Discovery labs. Ambos sistemas BioGenex systems funciones "todo-en-uno, todo a la vez" para las pruebas de células y tejidos, tales como inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* (ISH).

5 Como un ejemplo, un módulo de determinación utilizado en el sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento para determinar las medidas de nivel de biomarcadores de apendicitis el nivel de al menos un polipéptido biomarcador de apendicitis, por ejemplo, el módulo de determinación está configurado para detectar el nivel total (i.e., cantidad) de al menos un polipéptido biomarcador de apendicitis de la Tabla 1, utilizando cualquier sistema conocido para el análisis de la expresión de proteínas automatizado, incluyendo, por ejemplo, pero no limitando sistemas de espectrometría de masas, incluyendo MALDI-TOF, o sistemas de ionización-desorción láser asistida por matriz- tiempo de vuelo; sistemas de perfiles de matriz ProteinChip SELDI-TOF-MS, por ejemplo software máquinas con Ciphergen Protein Biology System II™; sistemas de análisis de datos de expresión génica (véase, por ejemplo U.S. 2003/0194711); sistemas para el análisis de expresión basada en matrices, por ejemplo los sistemas de matrices HT y sistemas de matriz de cartucho disponible de Affymetrix (Santa Clara, CA 95051) AutoLoader, sistema Complete GeneChip® Instrument, Fluidics Station 450, Hybridization Oven 645, QC Toolbox Software Kit, Scanner 3000 7G, Scanner 3000 7G plus Targeted Genotyping System, Scanner 3000 7G Whole-Genome Association System, GeneTitan™ Instrument, GeneChip® Array Station, HT Array; sistema ELISA automatizado (por ejemplo, DSX® o forma DS2® Dynax, Chantilly, VA o ENEASYSTEM III®, Triturus®, The Mago® Plus); Densitómetros (por ejemplo, X-Rite-508-Spectro Densitometer®, The HYRYS™ 2 densitometer); sistemas de hibridación *in situ* de fluorescencia automatizados (véase, por ejemplo Patente de los Estados Unidos 6,136,540); sistemas de imágenes 2D en gel junto con el software de imágenes 2-D; lectores de microplacas; clasificadores de células activados por fluorescencia (FACS) (por ejemplo citómetro de flujo FACSVantage SE, Becton Dickinson); y analizadores de radioisótopos (por ejemplo, contadores de centelleo).

El nivel de biomarcador de apendicitis puede ser el nivel de polipéptido biomarcador de apendicitis de cualquier biomarcador enumerado en la Tabla 1. El nivel de biomarcador de apendicitis puede ser polipéptido LRG (SEQ ID NO: 1). El nivel de biomarcador de apendicitis puede ser ORM (SEQ ID NO: 3) o MASP2 (SEQ ID NO: 5).

25 El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento pueden ser utilizados para medir al menos el nivel de biomarcador de apendicitis en la muestra biológica tal como una muestra de orina.

El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento pueden ser utilizados para medir al menos un nivel de biomarcador de apendicitis en la muestra biológica de orina que se obtiene de un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano. El sujeto puede tener al menos un síntoma de apendicitis como se discute en este documento.

30 El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describen en este documento pueden ser utilizados para medir al menos un nivel del biomarcador de apendicitis en la muestra biológica obtenida de un sujeto que ha experimentado uno o más síntomas de la apendicitis aguda incluyen dolor de partida centralmente legibles por ordenador (periumbilical) antes de la localización de la fosa ilíaca derecha (el lado inferior derecho del abdomen); pérdida de apetito y fiebre; náuseas o vómitos; la sensación de somnolencia; la sensación de mal estado general de salud; dolor que comienza y permanece en la fosa ilíaca derecha, diarrea y, por supuesto latente más prolongado; aumento de la frecuencia de la micción; arcadas marcadas; tenesmo o "impulso a la baja" (la sensación de que un movimiento de intestino aliviará las molestias); signo de Rovsing positivo, signo de Psoas, y/o señal de obturador.

40 El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento puede comprender un módulo de determinación que ha sido configurado para determinar el nivel de un agente adicional en la muestra biológica, por ejemplo, albúmina.

El sistema, medios legibles por ordenador y métodos que se describen en este documento pueden ser utilizados para medir al menos un nivel del biomarcador de apendicitis en una muestra biológica de orina para indicar si un sujeto tiene o está en riesgo de apendicitis aguda. De acuerdo con lo anterior, el sistema, medios legibles por ordenador y métodos legibles por ordenador como se describe en este documento se pueden utilizar para identificar si un sujeto tiene apendicitis aguda.

El sistema, medios legibles por ordenador y métodos como se describe en este documento pueden ser utilizados para medir al menos un nivel de biomarcador de apendicitis en una muestra biológica de orina obtenida de un sujeto.

50 Se describe un método de tratamiento de un sujeto identificado que tiene apendicitis aguda que comprende; (a) determinar si el sujeto tiene o es probable que tenga o está en riesgo de tener apendicitis aguda mediante la medición de al menos un nivel de biomarcador de apendicitis en una muestra de orina obtenida del sujeto, y si los altos niveles (por ejemplo, al menos aproximadamente 2- veces por encima de un nivel de referencia para el biomarcador medido) de la proteína biomarcador de apendicitis existe en la muestra biológica de orina del sujeto, esto indica que es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda, y (b) administrar un tratamiento apropiado para un sujeto determinado que es

probable que tenga apendicitis aguda, donde un tratamiento apropiado puede ser determinado por un médico normal, por ejemplo mediante resección quirúrgica del apéndice (i.e., apendicectomía) si la apendicitis es grave, o antibióticos si la apendicitis no es grave.

5 El método se puede llevar a cabo en un sujeto que ha experimentado o mostrado síntomas de la apendicitis aguda o uno o más de los siguientes síntomas o factores de riesgo: el dolor de inicio centralmente (periumbilical) antes de la localización de la fosa ilíaca derecha (el lado inferior derecho del abdomen); pérdida de apetito y fiebre; náuseas o vómitos; la sensación de somnolencia; la sensación de mal estado general de salud; el dolor que inicia y permanece en la fosa ilíaca derecha, diarrea y, por supuesto latente, más prolongado; aumento de la frecuencia de la micción; arcadas marcadas; tenesmo o "impulso a la baja" (la sensación de que un movimiento de intestino aliviará las molestias); El signo de Rovsing positivo, signo de Psoas, y/o señal de obturador.

15 La herramienta o dispositivo de diagnóstico puede ser utilizado para analizar una muestra de orina de un sujeto que ha experimentado o muestra síntomas de apendicitis aguda o uno o más de los siguientes síntomas o factores de riesgo: dolor que inicia centralmente (periumbilical) antes de la localización de la fosa ilíaca derecha (el lado inferior derecho del abdomen); pérdida de apetito y fiebre; náuseas o vómitos; la sensación de somnolencia; la sensación de mal estado general de salud; dolor que comienza y permanece en la fosa ilíaca derecha, diarrea y, por supuesto latente, más prolongado; aumento de la frecuencia de la micción; arcadas marcadas; tenesmo o "impulso a la baja" (la sensación de que un movimiento de intestino aliviará las molestias); signo de Rovsing positivo, signo de Psoas, y/o señal de obturador.

20 El dispositivo o los métodos como se describe en este documento se puede utilizar para evaluar la muestra de orina de un sujeto en uno o más tiempos indicados después de los síntomas experimentados específicos del sujeto, tales como síntomas iniciales (por ejemplo, a aproximadamente 1 hora, 2-5 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, y/o 72 horas.

25 Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descrita en este documento y como tal puede variar. La terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Definiciones de los términos

30 A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto normal en el arte a la que pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en urología, endocrinología, bioquímica y biología molecular se pueden encontrar en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, publicada por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: una obra de referencia integral, publicada por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); La guía de ELISA (Methods in Molecular Biology 149) de Crowther J. R. (2000); Fundamentals of RIA and Other Ligand Assays by Jeffrey Travis, 1979, Scientific Newsletters; e Immunology by Werner Luttmann, publicada por Elsevier, 2006.

40 A menos que se indique lo contrario, la presente invención se realizó utilizando procedimientos estándar, como se describe, por ejemplo, en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)) y Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.).

45 Como se utiliza en este documento, el término "biomarcador" es una característica biológica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos o patógenos normales (un biomarcador de diagnóstico), o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (un biomarcador terapéutico). Un "biomarcador" puede ser cualquier parámetro del paciente que se puede medir, por ejemplo, perfiles de expresión de ARNm, firmas proteómicas, proteínas, niveles de hormonas o de lípidos, métodos de formación de imágenes o señales eléctricas. Por lo general, el término "biomarcador" como se usa en este documento, se refiere a una proteína, polipéptido o péptido en la muestra.

50 La expresión "agente de unión de proteínas" se usa en este documento de forma intercambiable con "molécula de unión de proteína" o unidad estructural de unión de proteína" y se refiere a cualquier entidad que tiene afinidad específica por una proteína. La expresión "molécula de unión de proteínas" también incluye unidades estructurales de unión basadas en anticuerpos y anticuerpos e incluye moléculas de inmunoglobulina y determinantes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) a las proteínas Psap. La expresión "unidad estructural de unión basada en

anticuerpos" pretende incluir anticuerpos enteros, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con las proteínas Psap. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por lo tanto, el término incluye segmentos de porciones proteolíticamente escindido o preparados recombinantemente de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una cierta proteína. Los ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, dAbs y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio VL y VH unidos por un enlazante peptídico. Los scFv pueden ser de forma covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de unión. Por lo tanto, "unidad estructural de unión basada en anticuerpos" incluye preparaciones policlonales, monoclonales, u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. La expresión "unidad estructural de unión basada en anticuerpos" pretende incluir además anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, y moléculas quiméricas que tienen al menos un determinante de unión de antígeno derivado de una molécula de anticuerpo. La unidad estructural de unión basada en anticuerpos puede ser marcada de manera detectable. En algunos casos, un "agente de unión de proteína" es un cofactor o proteína de unión que interactúa con la proteína biomarcadora de apendicitis que se va a medir, por ejemplo, un cofactor o proteína de unión o ligando con la proteína biomarcadora de apendicitis.

La expresión "anticuerpo marcado", como se usa en este documento, incluye anticuerpos que están marcados por un medio detectable e incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que son marcados enzimáticamente, radiativamente, con fluorescencia, y quimioluminiscente. Los anticuerpos también se pueden marcar con una etiqueta detectable, tal como c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5 o HIS. La detección y cuantificación de una proteína biomarcadora de apendicitis presente en una muestra de orina se correlacionan con la intensidad de la señal emitida por el anticuerpo marcado de forma detectable.

La expresión "afinidad específica" o "se une específicamente" o "unión específica" se usan indistintamente en este documento se refiere a una entidad tal como una molécula de unión de proteínas o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido deseado (por ejemplo, una proteína biomarcadora de apendicitis específica), pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en la muestra, i.e., una muestra de orina. En algunos casos, la expresión "se une específicamente" se refiere a la unión con una K_d de 10 micromolar o menos, preferiblemente 1 micromolar o menos, más preferiblemente 100 nM o menos, 10 nM o menos, o 1 nM o menos.

El término "anticuerpo" pretende ser una proteína inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno. Anticuerpo como se usa en este documento se entiende que incluye fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, capaces de unirse al antígeno o fragmento antigénico de interés.

La expresión "anticuerpo humanizado" se utiliza en este documento para describir moléculas de anticuerpo completas, i.e., compuestas de dos cadenas ligeras completas y dos cadenas pesadas completas, así como anticuerpos que consisten únicamente en fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, en donde las CDR se derivan de una fuente no humana y la porción restante de la molécula Ig o fragmento del mismo se deriva de un anticuerpo humano, producen preferiblemente a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano.

Los términos "anticuerpo humano" y "anticuerpo humanizado" se utilizan en este documento para describir un anticuerpo del cual las porciones Hall o la mayoría (al menos 80%) de la molécula de anticuerpo se derivan de una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos humanos son los más deseables para uso en terapias de anticuerpos; como tales anticuerpos podrían provocar poca o ninguna respuesta inmune en el sujeto humano.

La expresión "anticuerpo quimérico" se usa en este documento para describir una molécula de anticuerpo, así como fragmentos de anticuerpos, como se describe anteriormente en la definición de la expresión "anticuerpo humanizado". La expresión "anticuerpo quimérico" abarca anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos tienen al menos una porción de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o ligera derivado de una primera especie de mamífero y otra parte de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o ligera derivada de un segundo diferentes especies, de mamíferos. En algunos casos, una región variable se deriva de una especie de mamífero no humano y la región constante se deriva de una especie humana. Específicamente, el anticuerpo quimérico se produce preferiblemente a partir de una secuencia de nucleótidos de un mamífero no humano que codifica una región variable y una secuencia de nucleótidos de un humano que codifica una región constante de un anticuerpo.

En el contexto de esta invención, el término "sonda" se refiere a una molécula que puede distinguir de forma detectable entre moléculas diana que difieren en estructura. La detección se puede llevar a cabo en una variedad de diferentes maneras, dependiendo del tipo de sonda utilizada y el tipo de molécula diana, así, por ejemplo, la detección puede basarse en la discriminación de niveles de actividad de la molécula diana, pero preferiblemente se basa en la detección de la unión específica. Ejemplos de dicha unión específica incluyen la unión de anticuerpos y la hibridación de la sonda de ácido nucleico. Así, por ejemplo, las sondas pueden incluir sustratos de enzimas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y preferiblemente sondas de hibridación de ácidos nucleicos.

El término "marcador" se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia del polinucleótido diana en una muestra de análisis. Los marcadores apropiados incluyen radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, unidades estructurales quimioluminiscentes, partículas magnéticas, unidades estructurales bioluminiscentes, y similares. Como tal, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

El término "agente" como se utiliza en este documento, se refiere a una entidad química o producto biológico, o una combinación de entidades químicas o productos biológicos. La entidad química o producto biológica es preferiblemente, pero no necesariamente un compuesto de bajo peso molecular, pero también puede ser un compuesto más grande, por ejemplo, un oligómero de ácidos nucleicos, aminoácidos, o carbohidratos incluyendo, sin limitación proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glicoproteínas, siARNs, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos. El término "agente" se refiere a cualquier entidad seleccionada de un grupo que comprende; productos químicos; moléculas pequeñas; secuencias de ácido nucleico; análogos de ácido nucleico; proteínas; péptidos; aptámeros; anticuerpos; o fragmentos de los mismos. Una secuencia de ácido nucleico puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenario o bicatenario, y puede ser seleccionado de un grupo que comprende; ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, ácido péptido-nucleico (PNA), PNA pseudocomplementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, pero no limitado a, proteínas que codifican secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo, que actúan como represores de la transcripción, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias de ácidos nucleicos inhibitorias, por ejemplo, pero no limitado a ARNi, shARNi, siARN, micro ARNi (mARNi), oligonucleótidos antisentido etc. Un agente de la proteína y/o péptido puede ser cualquier proteína de interés, por ejemplo, pero no limitados a; proteínas mutadas; proteínas terapéuticas; proteínas truncadas, en donde la proteína es normalmente ausente o expresada a niveles más bajos en la célula. Las proteínas también se pueden seleccionar de un grupo que comprende; proteínas mutadas, proteínas de ingeniería genética, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, midicuerpos, tricuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizadas, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos. En algunos casos, el agente es cualquier sustancia química, entidad o unidad estructural, incluyendo, sin limitación entidades no proteicas sintéticas y de origen natural. En ciertos casos, el agente es una molécula pequeña que tiene una unidad estructural química. Por ejemplo, unidades estructurales químicas incluyen unidades estructurales sustituidas o no sustituidas, aromáticas, o heterocíclicas incluyendo macrólidos, leptomicinas y productos naturales relacionados o análogos de los mismos. Los agentes pueden ser conocidos por tener una actividad y/o propiedad deseada, o pueden ser seleccionados de una biblioteca de diversos compuestos.

El término "soporte" se refiere a soportes convencionales tales como perlas, partículas, varillas indicadoras, fibras, filtros, membranas y silano o soportes de silicato tales como portaobjetos de vidrio.

Los términos "reducido" o "reducir" o "disminuir" como se utiliza en este documento generalmente significa una disminución en una cantidad estadísticamente significativa en relación a una referencia. Sin embargo, para evitar dudas, "reducida" significa disminución estadísticamente significativa de al menos 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo una disminución de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50 %, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, al menos 90% o más, hasta e incluyendo una disminución del 100% (i.e., nivel ausente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier descenso entre 10–100% en comparación con un nivel de referencia, tal como se define este término en este documento.

El término "bajo", como se usa en este documento significa generalmente inferior por una cantidad estadísticamente significativa; para evitar dudas, "bajo" significa un valor estadísticamente significativo al menos 10% más bajo que un nivel de referencia, por ejemplo, un valor de al menos 20% más bajo que un nivel de referencia, al menos 30% más bajo que un nivel de referencia, al menos 40% más bajo que un nivel de referencia, al menos 50% más bajo que un nivel de referencia, al menos 60% más bajo que un nivel de referencia, al menos 70% más bajo que un nivel de referencia, al menos 80% más bajo que un nivel de referencia, al menos 90% más bajo que un nivel de referencia, hasta e incluyendo el 100% más bajo que un nivel de referencia (i.e., nivel ausente en comparación con una muestra de referencia).

Las expresiones "aumentar" o "aumento" como se usa en este documento generalmente significa un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; para evitar dudas, "aumentar" significa un aumento estadísticamente significativo de al menos 10% como comparar a un nivel de referencia, incluyendo un aumento de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100% o más, incluyendo, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces de aumento o más en comparación con un nivel de referencia, como ese término se define en este documento.

El término "alto" como se usa en este documento significa generalmente un superior en una cantidad estadísticamente significativa respecto a una referencia; para evitar dudas, "alto" significa un valor estadísticamente significativo al menos 10% mayor que un nivel de referencia, por ejemplo al menos 20% mayor, al menos 30% mayor, al menos 40% mayor, al

menos 50% mayor, al menos 60% mayor, al menos 70% mayor, al menos 80% mayor, al menos 90% mayor, al menos 100% mayor, al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor o más, en comparación con un nivel de referencia.

5 Como se utiliza en este documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refiere a la reducción o disminución medible de uno o más síntomas o indicadores que permiten medir una enfermedad o trastorno; mientras que no se pretende estar limitado a tal, enfermedad o trastornos de interés particular incluyen lesión isquémica o isquemia/reperfusión y diabetes. La disminución medible incluye cualquier disminución estadísticamente significativa en un marcador medible o síntoma.

10 Como se utiliza en este documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refiere a la prevención o retraso en la manifestación de uno o más síntomas o indicadores que permiten medir una enfermedad o trastorno. Un retraso en la manifestación de un síntoma o marcador es un retraso en relación con el momento en el que tales síntomas o marcadores se manifiestan en un sujeto control o sin tratar con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o trastorno. Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" no sólo incluyen la evitación completa o la prevención de los síntomas o marcadores, pero también una reducción en la gravedad o grado de cualquiera de estos síntomas o marcadores, en relación con los síntomas o marcadores que surgen en un individuo control o no tratado con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o trastorno, o síntomas o marcadores relativos probablemente aumentan basándose en medidas históricas o estadísticas de las poblaciones afectadas por la enfermedad o trastorno. Por "severidad reducida" se entiende al menos una reducción del 10% en la gravedad o grado de un síntoma o marcador de enfermedad que se puede medir, respecto a un control o referencia, por ejemplo, al menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o incluso 100% (i.e., no hay síntomas o marcadores que se puedan medir).

25 Como se utiliza en este documento, el término "nivel de referencia" se utiliza en este documento en forma intercambiable con "valor de referencia" y se refiere a un nivel de un biomarcador de apendicitis particular que proporciona un punto de referencia con el que comparar el nivel de proteína biomarcadora de apendicitis medida a partir de la muestra biológica de orina de prueba. Como un ejemplo ilustrativo, el nivel de referencia para una proteína biomarcadora de apendicitis particular, se puede calcular como el nivel medio de que el nivel de proteína biomarcadora de apendicitis de una pluralidad de muestras biológicas de orina obtenida a partir de una pluralidad de sujetos con datos demográficos similares (i.e., edad, sexo, peso, origen étnico y similares) que no tienen apendicitis. Ya que sólo otro ejemplo ilustrativo, un nivel de referencia para una proteína biomarcadora de apendicitis particular puede ser a partir de una pluralidad de sujetos que no tienen apendicitis. Ya que sólo otro ejemplo ilustrativo, un nivel de referencia para una proteína biomarcadora de apendicitis particular del mismo sujeto tomada en un punto de tiempo anterior. Por lo general, un nivel de referencia se normaliza con el valor "0", y un aumento, por ejemplo, al menos aproximadamente un aumento de 2 veces en la proteína biomarcadora de apendicitis particular, medida por el módulo de determinación o en el sistema y los métodos como se revela en este documento con relación al nivel de referencia indicaría que un sujeto probablemente tendría la apendicitis (i.e., un resultado de la prueba de apendicitis positivo). Un nivel del biomarcador de apendicitis de referencia puede ser de un individuo no afectado por una patología dada (i.e., no afectado con apendicitis o que tiene un síntoma de apendicitis), o, alternativamente, del mismo individuo que se prueba, donde estaba la orina para el nivel de biomarcador de apendicitis referencia adoptado en al menos un punto antes de tiempo (i.e., para, t_0 , t_1 , t_2 , etc.) cuando el sujeto no mostró un síntoma de apendicitis. Un nivel de biomarcador de apendicitis de referencia también puede ser una muestra colectiva, tomada de una pluralidad de individuos no afectados por la apendicitis. Cuando sea apropiado, un nivel de biomarcador de apendicitis referencia también puede ser un nivel de referencia fijo de un nivel biomarcador de apendicitis, donde un nivel de biomarcador de apendicitis de prueba por encima del nivel de referencia fijo (i.e., al menos aproximadamente 2 veces por encima del nivel de referencia fijo) identifica un sujeto que es probable que tenga apendicitis. Se prefiere que sea una muestra de referencia de un individuo o grupo de individuos de características similares a la persona examinada, por ejemplo, que la referencia se tomará de los individuos de la misma edad, género, delirio u origen étnico, etc. Otros niveles de referencia también pueden ser utilizados, por ejemplo, un nivel positivo biomarcador de apendicitis referencia se puede utilizar como un control positivo para un sujeto que tiene un riesgo de apendicitis aguda. Por lo general, cuando se utiliza un nivel de referencia positiva, si el nivel de biomarcador de apendicitis en la muestra biológica de orina para analizar es sustancialmente igual o cercano en el valor del nivel de biomarcador de apendicitis de referencia positivo, indicaría un resultado de prueba positivo para la apendicitis aguda.

55 El término "equipo" se puede referir a cualquier aparato no humano que es capaz de aceptar una entrada estructurada, el procesamiento de la entrada estructurada de acuerdo con reglas prescritas, y producir resultados del procesamiento como salida. Ejemplos de un ordenador incluyen: un ordenador; un ordenador de propósito general; un superordenador; una unidad central; un super miniordenador; un mini-ordenador; una estación de trabajo; un microordenador; un servidor; una televisión interactiva; una combinación híbrida de un ordenador y una televisión interactiva; y hardware específico de la aplicación para emular un ordenador y/o software. Un ordenador puede tener un único procesador o múltiples procesadores, que pueden funcionar en paralelo y/o no en paralelo. Un ordenador también se refiere a dos o más ordenadores conectados entre sí a través de una red para transmitir o recibir información entre los ordenadores. Un

ejemplo de dicho ordenador incluye un sistema informático distribuido para procesar información por medio de ordenadores enlazados por una red.

5 La expresión "medio legible por ordenador" puede referirse a cualquier dispositivo de almacenamiento usado para almacenar datos accesibles por un ordenador, así como cualesquiera otros medios para proporcionar acceso a los datos por un ordenador. Ejemplos de un medio legible por ordenador de tipo dispositivo de almacenamiento incluyen: un disco duro magnético; un disquete; un disco óptico, tales como un CD-ROM y un DVD; una cinta magnética; un chip de memoria.

El término "software" puede referirse a las reglas prescritas para operar un ordenador. Ejemplos de software incluyen: software; segmentos de código; instrucciones; programas de ordenador; y lógica programada.

10 La expresión "sistema informático" puede referirse a un sistema que tiene un ordenador, donde el ordenador cuenta con un software incorporado en un medio legible por ordenador para hacer funcionar el ordenador.

El término "proteómica" puede referirse al estudio de la expresión, estructura y función de las proteínas dentro de las células, incluyendo la forma en que trabajan e interactúan entre sí, proporcionando información diferente de análisis genómico de la expresión génica.

15 Como se utiliza en este documento, la expresión "consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos requeridos para una realización determinada. El término permite la presencia de elementos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) o funcional(es) de dicha realización de la invención.

20 Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con los porcentajes puede significar un $\pm 1\%$.

25 Los términos singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" se pretende que incluya "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se debe entender que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente descripción, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. La abreviatura, "por ejemplo" se deriva de Latin *exempli gratia*, y se utiliza en este documento para indicar un ejemplo no limitativo. De este modo, la abreviatura "por ejemplo" es sinónimo del término "por ejemplo".

30 Como se utiliza en este documento, el término "que comprende" significa que otros elementos también pueden estar presentes además de los elementos definidos presentados, ya sea esencial o no. El uso de "que comprende" indica inclusión y no limitación.

35 Como se utiliza en este documento, la expresión "consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos requeridos para una realización determinada. El término permite la presencia de elementos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) o funcional(es) de dicha realización de la invención.

La expresión "que consiste en" se refiere a kits y métodos de los mismos como se describe en este documento, que son exclusivas de cualquier elemento no descrito en esta descripción de la realización.

Descrito en este documento, por cualquiera de los siguientes párrafos alfabéticos, es:

40 [A] Un dispositivo para detectar al menos una proteína biomarcadora de apendicitis en una muestra de orina de un sujeto para identificar si es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda, el dispositivo que comprende: (a) al menos una agente de unión de proteína que se une específicamente a al menos una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo de: leucina α -2 glucoproteína (LRG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); y (b) al menos un soporte sólido para el al menos un agente de unión de proteína en (a), en donde el agente de unión de proteína se deposita sobre el soporte sólido.

45 [B] El dispositivo del párrafo [A], en donde el agente de unión de proteína depositado sobre el soporte sólido se une específicamente al polipéptido de leucina α -2 glucoproteína (LRG) de la SEQ ID NO: 1.

[C] El dispositivo del párrafo [A], en donde el agente de unión de proteína depositado sobre el soporte sólido se une específicamente al polipéptido de la α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM) de la SEQ ID NO: 3.

- [D] El dispositivo del párrafo [A], en donde el agente de unión de proteína depositado sobre el soporte sólido se une específicamente al polipéptido de lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2) de la SEQ ID NO: 5.
- [E] El dispositivo del párrafo [A], en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína adicional diferente depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo que consiste en: α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG); S100-A8 (calgranulina); α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antitripsina (SERPINA3).
- [F] El dispositivo del párrafo [A], en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína adicional diferente depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionado del grupo que consiste en: molécula de adhesión específica de adipocito; AMBP; Proteína tipo amiloide 2; Enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; Anhidrasa carbónica 1; CD14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; Hemoglobina α ; Hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de inter- α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrin; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción PDZK1 1; PRIC285; Prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS1; SPRX2; Supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VAOD1; molécula de adhesión vascular 1; Versican; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; y β -1,3-galactosiltransferasa.
- [G] El dispositivo del párrafo [A], en donde el soporte sólido está en el formato de una varilla indicadora, chip microfluídico o un cartucho.
- [H] El dispositivo de cualquiera de los párrafos [A] a [G], en donde el agente de unión de proteína es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, molécula pequeña o variante de los mismos.
- [I] El dispositivo de cualquiera de los párrafos [A] a [H], en donde el sujeto es un sujeto humano.
- [J] El dispositivo de cualquiera de los párrafos [A] a [I], en donde el sujeto es un sujeto con al menos un síntoma de apendicitis.
- [K] El dispositivo de cualquiera de los párrafos [A] a [J], en donde el agente de unión de proteína depositado en el dispositivo se une específicamente a la proteína biomarcadora de apendicitis cuando el nivel de la proteína biomarcadora de apendicitis es al menos 2 veces por encima de un nivel de referencia para la proteína biomarcadora.
- [L] Un dispositivo del párrafo [K], en donde el nivel de referencia es un nivel medio de la proteína biomarcadora de apendicitis en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda.
- [M] Uso del dispositivo de cualquiera de los párrafos [A] a [L] para identificar si un sujeto tiene apendicitis aguda, en donde sí al menos una proteína biomarcadora de apendicitis se une específicamente a al menos un agente de unión de proteína, es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda.
- [N] Un kit que comprende: (a) un dispositivo de acuerdo con cualquiera de los párrafos [A] a [L]; y (b) un primer agente, en donde el primer agente produce una señal detectable en presencia de un agente de unión de proteína que se depositó en el dispositivo es específicamente unido a una proteína biomarcadora de apendicitis.
- [O] El kit de párrafo [N], que comprende además un segundo agente, en donde el segundo agente produce una señal detectable diferente en la presencia de un segundo agente de unión de proteína depositado en el dispositivo que se une específicamente a una segunda proteína biomarcadora de apendicitis.
- [P] Un método para identificar la probabilidad de que un sujeto tenga apendicitis aguda que comprende: (a) medir el nivel de la al menos una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo enumerado en la Tabla 1 en una muestra de orina del sujeto humano; (b) comparar el nivel de la proteína de al menos un biomarcador de apendicitis medida en la etapa (a) a un nivel de referencia para el biomarcador medido; en donde si el nivel de la proteína biomarcadora de apendicitis medido es al menos 2 veces mayor que el nivel de referencia para la proteína biomarcadora de apendicitis, se identifica que es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda.
- [Q] El método del párrafo [P], que comprende además determinar el nivel de albúmina en la muestra de orina del sujeto humano.

[R] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[Q], en donde el ser humano representa al menos un síntoma de apendicitis aguda.

[S] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[R], en donde la medición se completa con el uso de un inmunoensayo o un inmunoensayo automatizado.

5 [T] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[S], en donde la proteína biomarcadora de apendicitis es leucina α -2 glucoproteína (LRG).

[U] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[T], en donde el biomarcador de apendicitis es α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM).

10 [V] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[U], en donde la proteína biomarcadora de apendicitis es lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2).

[W] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[S], en donde la proteína biomarcadora de apendicitis se selecciona de un grupo que consiste en leucina α -2 glucoproteína (LRG), calgranulina A (S100-A8), α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM), plasminógeno (PLG), lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), Zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1), α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) y apolipoproteína D (ApoD).

15 [X] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[W], en donde el nivel de referencia es un nivel de la proteína biomarcadora de apendicitis en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda.

[Y] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[W], en donde el nivel de referencia es un nivel medio de la proteína biomarcadora de apendicitis en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda.

20 [Z] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[W], en donde el nivel de referencia es un nivel normalizado de la proteína biomarcadora de apendicitis en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, en donde la normalización se lleva a cabo en contra del nivel de albúmina en la muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda.

[AA] El método de cualquiera de los párrafos [P]–[Z], en donde la muestra de orina se recoge en la corriente media.

25 [BB] El método de cualquiera de párrafo [P]–[Z], en donde la muestra de orina se obtiene depositando la orina en una tira de ensayo.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLO 1

Proteómica de orina para el perfilado de enfermedad humana utilizando espectrometría de masas de alta precisión

30 El conocimiento de los componentes biológicamente relevantes de tejidos humanos ha permitido la invención de numerosas pruebas de diagnóstico clínicamente útiles, así como las formas no invasivas de seguimiento de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. En virtud de la perfusión tisular, suero de la sangre es el material más útil para el descubrimiento de tales biomarcadores en general. Sin embargo, la concentración relativamente alta de proteínas de suero, así como su amplia gama de concentraciones, que abarca al menos 9 órdenes de magnitud, a menudo limitan el estudio de biomarcadores séricos [1], aunque diversos enfoques recientes son prometedores [2–4].

35 Por otra parte, de los fluidos biológicos susceptibles de evaluación clínica de rutina, la orina tiene la ventaja de ser disponible con frecuencia y de forma no invasiva, abundante, y como resultado de ser un filtrado de suero, relativamente simple en su composición. En consecuencia, la detección de proteínas en orina se ha utilizado para identificar marcadores de enfermedad que afecta el riñón y el tracto urogenital [5, 6], así como los órganos distales, tales como el cerebro y el intestino [7, 8]. Sin embargo, la comprensión actual de la proteoma urinario humana es incompleta, específicamente con respecto a su composición y dinámica general, por no hablar de la identidad de los componentes variables que pueden depender del estado fisiológico y la enfermedad.

40 Varios enfoques se han utilizado para caracterizar el proteoma urinario humano. Los estudios iniciales utilizando electroforesis e inmunotransferencia fueron capaces de identificar decenas de proteínas urinarias abundantes y raras [9]. Recientemente, Pisitkun and colleagues aplicaron espectrometría de masas en tándem (MS/MS) ultracentrifugación y cromatografía líquida (LC) para identificar 295 altamente abundantes proteínas únicas aisladas de exosomas urinario [10] aplicaron. Sun and colleagues identificaron 226 proteínas solubles mediante el uso LC-MS/MS multidimensional

[11]. Para una visión general, véase Pisitkun et al [12]. Y, más recientemente, Adachi and colleagues identificaron más de 1,500 proteínas únicas de la orina ultrafiltrada con un alto grado de precisión mediante el uso de un espectrómetro de masas trap– Orbitrap de iones lineal híbrido (LTQ–Orbitrap) [13].

5 Los inventores en este documento extienden la caracterización actual del proteoma urinario humano por fraccionamiento ampliamente de orina utilizando ultracentrifugación, electroforesis en gel, intercambio iónico y cromatografía de fase inversa, reduciendo efectivamente la complejidad de la mezcla mientras se minimiza la pérdida de material. Mediante el uso de mediciones de masa de alta precisión del espectrómetro de masas LTQ–Orbitrap y LC–MS/MS de los péptidos generados a partir de dichas muestras ampliamente fraccionados, los inventores identificaron más de 2,000 proteínas únicas en las muestras de orina individuales recogidas de manera sistemática. Los inventores proporcionan evaluaciones de los orígenes físicos y de tejido del proteoma urinario, así como la dependencia de su detección en variables instrumentales e individuales. Por último, mediante el uso de la minería de texto y el aprendizaje de máquina los inventores anotan el proteoma urinario con respecto a 27 común y más de 500 enfermedades humanas raras, estableciendo de ese modo un recurso muy útil para el estudio de la fisiopatología humana y el descubrimiento de biomarcadores.

15 Materiales y Métodos para el Ejemplo 1

20 Recogida de muestras. Se recogió la orina como muestra limpia, las muestras de flujo medio como parte de la evaluación de rutina de 12 niños y adultos jóvenes (edades 1–18 años, mediana 11) que se presentan con dolor abdominal agudo en el servicio de urgencias del Hospital Infantil de Boston. Tras obtener el consentimiento informado, la orina se congeló a –80°C en alícuotas de 12 mL en tubos de polietileno. Todas las muestras se congelaron dentro de las 6 horas de la recogida.

Reactivos. Todos los reactivos fueron de la más alta pureza disponible y adquiridos de Sigma Aldrich a menos que se especifique lo contrario. Los solventes de grado HPLC se adquirieron de Burdick and Jackson.

25 Sedimento de orina. Las alícuotas se descongelaron y se centrifugaron a 17,000 g durante 15 minutos a 10°C para sedimentar los restos celulares. La ausencia de células intactas en el sedimento se confirmó por microscopía de luz (datos no mostrados). Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 210,000 g durante 60 minutos a 4°C para sedimentar las vesículas y complejos de alto peso molecular. Los pellets se resuspendieron en 0.5 mL de 0.1 X solución reguladora de Laemmli, se concentraron 10 veces a 0.05 mL por centrifugación al vacío y se almacenaron a –80°C.

30 Cromatografía de intercambio de cationes. El sobrenadante que queda después de ultracentrifugación se diluyó 5 veces con ácido acético 0.1 M, 10% (v/v) de metanol, pH 2.7 (solución reguladora A) y se incubó con 1 mL de 50% (v/v) de suspensión de SP Sephadex (perlas 40–120 μ m, Amersham) durante 30 minutos a 4°C, para adsorber péptidos que son <30 kDa de peso molecular. Tras lavar las perlas dos veces con solución reguladora A, péptidos se eluyeron mediante la incubación de las perlas en 5 mL de acetato de amonio 0.5 M, 10% (v/v) de metanol, pH 7 durante 30 minutos a 4°C. Los péptidos eluidos se purificaron por cromatografía de fase inversa mediante el uso de columnas de centrifugado PepClean C–18, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce). Los solventes de purificación residuales se separaron por centrifugación al vacío y pequeñas proteínas y péptidos se resuspendieron en solución reguladora acuosa de bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.5).

40 Precipitación de proteínas. Las proteínas restantes en solución después de intercambio catiónico se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético al 20% (p/v), con desoxicolato al 0.02% (p/v) y Triton X–100 al 2.5% (v/v) como portadores, e incubando las muestras durante 16 horas a 4°C. Los precipitados se sedimentaron a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C y pellets se lavaron dos veces con acetona pura a 4°C con acetona residual eliminado por secado al aire. Los gránulos secos se resuspendieron en 0.1 mL de 1 x solución reguladora de Laemmli.

45 Electroforesis en gel. Las fracciones suspendidas en solución reguladora Laemmli (de 17,000 g y 210,000 g centrifugación, y de la precipitación de proteínas) se incubaron a 70°C, durante 15 min y se separaron mediante el uso de NuPage 10% de geles de poli(acrilamida Bis–Tris de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los geles se lavaron tres veces con agua destilada, fijadas con 5% (v/v) de ácido acético en 50% (v/v) de metanol acuoso durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron con Coomassie. Cada carril de gel se cortó en fragmentos 6 y cada fragmento se cortó en aproximadamente partículas de 1 mm³, que se lavaron posteriormente 3 veces con agua y una vez con acetonitrilo.

50 Reducción, alquilación y tripsinización de proteínas. Las partículas de gel que contienen proteína y proteínas purificadas de intercambio de cationes se redujeron con ditiotreitól 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.5) a 56°C, durante 45 minutos. Estos fueron posteriormente alquilados con yodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.5) a temperatura ambiente en la oscuridad, durante 30 minutos. Las partículas de gel se lavaron 3 veces con bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.5) antes de la digestión. Los péptidos alquilados se purificaron mediante el uso de columnas de centrifugación PepClean C–18 como se describió anteriormente para eliminar yodoacetamida residual de

la fracción de intercambio catiónico. Después se digirieron con 12.5 ng/mL de bovina tripsina de grado de secuenciación en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.5) a 37°C, durante 16 horas. Los productos tripticos se purificaron mediante el uso de columnas de centrifugación PepClean C-18 como se describió anteriormente, se centrifugaron a vacío y se almacenaron a -80°C.

5 Espectrometría de masas y cromatografía líquida. Las fracciones que contenían péptidos tripticos disueltos en acetonitrilo acuoso al 5% (v/v) y ácido fórmico al 0.1% (v/v) se resolvieron e ionizaron mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución con nanoflujo (nanoLC, Eksigent) acoplado al espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). La cromatografía nanoflujo e ionización por electroaspersión se llevaron a cabo mediante el uso de un capilar de sílica fundida de 15 cm con 100 mm de diámetro interior, empacada en casa con resina Magic C18 (200 Å, 5 μm, Michrom Bioresources). Se inyectaron mezclas de péptidos en la columna a una velocidad de flujo de 1000 nL/min y se resolvieron a 400 nL/min utilizando 45 min de gradientes lineales de acetonitrilo 5-40% (v/v) de acetonitrilo acuoso en ácido fórmico al 0.1% (v/v). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de adquisición dependiente de datos, la grabación de alta precisión y espectros Orbitrap de inspección de alta resolución utilizando la masa de bloqueo para calibración de masa interna, con la resolución de 60,000 y rango m/z de 350-2000. Seis iones cargados se multiplican más intensas fueron fragmentados secuencialmente mediante el uso de disociación inducida por colisión, y los espectros de sus fragmentos se registraron en la trampa de iones lineal, con la exclusión dinámica de iones precursores ya seleccionados para MS/MS de 60 seg.

20 Procesamiento espectral e identificación del péptido. Un programa de software escrito habitual se utilizó para extraer los 200 picos más intensos de cada espectro MS/MS y para generar archivos de formato mascota genérico. Se realizaron búsquedas de listas máximas en la base de datos human International Protein Index (versión 3.36, en la World Wide Web de "ebi.ac.uk/IPI") mediante el uso de Mascota (versión 2.1.04; Matrix Science), lo que permite la formación de la variable de N-piroglutamato, Asn y Gln desamidación, N-acetilación y oxidación de metionina, lo que requiere escisión de tripsina completa de los péptidos identificados con 2 misescisiones posibles, y tolerancias de masa de 5 ppm y 0.8 Da para los iones precursores y de fragmentos, respectivamente. Búsquedas que permiten péptidos semitripticos no afectó los rendimientos de búsqueda general (datos no mostrados). Los recuentos espectrales se calcularon sumando el número de espectros de iones de fragmentos asignados a cada péptido precursor único.

30 Datos de análisis. Evaluación de la precisión de la identificación se llevó a cabo mediante la búsqueda en una base de datos señuelo compuesta de secuencias de proteínas reversa de la base de datos IPI diana. La frecuencia de identificaciones positivas falsas aparentes se calculó mediante la fusión de las búsquedas de destino y diana individuales para cada muestra. Una primera estimación de la tasa de falsos positivos aparentes se obtuvo dividiendo el número de identificaciones de péptidos con una puntuación Mascot superior a la puntuación de identidad obtenida a partir de la búsqueda diana por el número de identificaciones de péptidos con una puntuación más alta que el umbral de puntuación de la identidad extraída de la búsqueda señuelo [37]. Sólo proteínas identificadas sobre la base de más de 2 péptidos se incluyeron en la comparación. La agrupación de proteínas parsimoniosa se realizó mediante la reasignación de todas las identificaciones de péptidos en sus correspondientes proteínas como se enumera en el IPI. Esta etapa fue necesaria para generar una lista mínima, no redundante de proteínas que explican todos los péptidos identificados, mientras que excluye las proteínas que no podrían ser inequívocamente identificados. Esta lista parsimoniosa de proteínas fue utilizada para la comparación de diversas muestras a nivel de proteínas. Para anotación Gene Ontology, los inventores utilizan los términos GO slim versión 1.8, se accede mediante el uso de GOfact (en la World Wide Web de "hupo.org.cn/GOfact"). Para la anotación de la expresión tisular de proteínas detectadas, los inventores utilizaron la versión 2 del atlas de expresión génica GNF (en la World Wide Web de "expression.gnf.org"), acceso mediante BioMart (en la World Wide Web de "bioMart.org").

45 Anotaciones de enfermedad. Las proteínas vinculadas de los inventores encontrados en el proteoma urinario a los artículos publicados que asocian una proteína con una enfermedad humana, así artículos que asocian una enfermedad con una proteína. En el primer caso, los inventores derivan conjuntos de enfermedades de OMIM [38], MeSH (en la World Wide Web de "nlm.nih.gov/mesh/"), y una breve lista de las enfermedades comunes de interés no descritas en OMIM o MeSH (archivos adicionales, en la World Wide Web de "childrenshospital.org/research/steenlab"). Los inventores extrajeron los nombres de las enfermedades de MeSH mediante la selección de conceptos MeSH con DescriptorRecord DescriptorClass = 1, y marcados por SemanticTypeName 'Disease o Syndrome'. Los nombres de las enfermedades de sinónimos se obtuvieron a partir del contenido Term o elementos TermList para el concepto principal. Para OMIM, documentos que coincidan con una entrada OMIM se obtuvieron mediante la búsqueda en Medline con una consulta de la forma (Term1 OR Term2 ...Termk), donde Termk incluye los 100 términos de frecuencia más baja en una entrada OMIM dada. Estas consultas enfermedad OMIM fueron ejecutados mediante el uso de Twease con el anotador BM25EC contra los resúmenes de Medline [39], consultado el 7 de julio de 2008. Los documentos que corresponden a la consulta con una puntuación BM25EC por encima de un Z-score de 10 fueron considerados búsqueda de la enfermedad OMIM [40]. Cada nombre de la enfermedad y sinónimos MeSH se expresaron como una consulta de la forma ("disease name" ["alias 1" "alias 2" ...]). Los nombres de las enfermedades comunes se expresaron como una consulta de frase única.

Para determinar enfermedades que están asociadas con una proteína dada, los inventores consultan BioMart mediante el uso de identificadores de IPI para las proteínas en el proteoma urinario para obtener descripciones de proteínas y nombres de genes correspondientes. Las consultas de la forma (IPI-id|"description"| GeneName) se generaron para cada proteína, donde IPI-id es el identificador IPI, y la descripción es la frase de descripción recuperada de BioMart. Estas consultas se realizaron contra Medline utilizando Twease con el deslizador de parámetros ajustado a 0. Las listas de documentos que corresponden a nombres de las proteínas se almacenaron y solaparon con las listas de documentos que corresponden a enfermedades. Los pares de proteínas de enfermedad asociados que coincidían con menos de 5 documentos se descartaron (examen manual indican que este nivel de solapamiento sucede con frecuencia como un artefacto del procedimiento de búsqueda). Para aumentar aún más la rigurosidad de las asociaciones de literatura de enfermedades de proteína, los inventores estiman las probabilidades de que el número de documentos solapados encuentran entre una enfermedad y proteína dada podría ocurrir por casualidad, considerando el número de documentos que corresponden a la enfermedad o las proteínas en Medline. Se reportaron solamente los pares de nombre/nombres de la enfermedad de proteínas con el cociente de posibilidades mayores de 2,000. Las listas de los documentos superpuestos fueron formateadas en archivos HTML organizados en jerarquías de enfermedades o proteínas.

Lista de abreviaturas. Cromatografía líquida–espectrometría de masas en tándem (LC–MS/MS), trampa de iones lineal (LTQ).

Resultados

Captura de proteína exhaustiva de la orina humana recogida de manera sistemática

Con el fin de identificar las proteínas urinarias médicamente útiles, los inventores obtuvieron orina como contaminada de, muestras de orina en medio de la corriente como recogidos de manera sistemática, recogidos en el momento de la evaluación clínica. Los inventores examinaron muestras de orina de 12 niños y adultos jóvenes evaluados para el dolor abdominal en el servicio de urgencias, todos los cuales eran previamente sanos. También se examinaron las muestras de orina de pacientes asintomáticos evaluados 6–8 semanas después de que fueron sometidos a apendicectomía. Todas las muestras de orina mostraron perfiles normales sin evidencia de enfermedad renal o infección, tal como se evaluó mediante el uso de análisis de orina clínica (datos no mostrados). Todas las muestras de orina se congelaron dentro de las 6 horas de la recogida, de acuerdo con el análisis temporal anterior de muestras de orina completas que indicaban que sin degradación detectable ocurrió durante todo el tiempo como 24 horas de almacenamiento refrigerado a 4°C con posterior congelación a –80°C [14–16]. Esto se espera dado el hecho de que la orina se almacena *in situ* durante muchas horas en la vejiga, alcanzando un equilibrio fisiológico antes de la recogida.

La orina es una mezcla compleja con proteínas abundantes tales como albúmina y uromodulina que oscurecen la identificación de las proteínas menos concentradas, biológicamente más informativas tales como citocinas y hormonas secretadas, por ejemplo. Por lo tanto, los inventores adoptaron un método de fraccionamiento que reduce la complejidad mezcla mientras se minimiza la pérdida de material por primera ultracentrifugación para fraccionar exosomas urinarios y otros complejos de alto peso molecular a partir de péptidos y proteínas solubles, posteriormente capturando este último mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico de exclusión molecular y precipitación de ácido tricloroacético, respectivamente, que se ha demostrado para capturar más de 95% de las proteínas en condiciones similares [17, 18].

Los fraccionamientos secundarios y terciarios de las proteínas y péptidos así capturados fueron logrados utilizando un SDS–PAGE dimensional de las fracciones de ultracentrifugación y precipitación, y la cromatografía líquida de los péptidos trípticos de proteínas resueltas de SDS–PAGE, respectivamente. Como resultado, las proteínas de alta abundancia, tales como albúmina y uromodulina, que comprendería de otro modo más de 99% de la mezcla, se pueden separar efectivamente de la mayor parte del proteoma (Fig. 1). Aunque la composición y la concentración de la orina varía con el estado fisiológico, había menos de $10 \pm 10\%$ (media \pm desviación estándar) de diferencia en la abundancia de proteína total entre muestras individuales, tal como se determina mediante el uso de la densitometría imagen de gel (Fig. 1), similar a estudios anteriores de la orina de los niños [19–21].

Identificación precisa y completa de los proteomas urinarios

Con el fin de maximizar la sensibilidad de la detección y reducir al mínimo los errores de identificación, los inventores utilizaron el espectrómetro de masas híbrido LTQ–Orbitrap recientemente desarrollado para la secuenciación de péptidos trípticos de los proteomas fraccionados anteriores. Un conjunto representativo de los espectros de masas en tándem se muestra en la Fig. 2, logrando errores en masa de menos de 2 ppm para la mayoría de los análisis de LC/MS como se juzga a partir del análisis de péptidos de autólisis de tripsina (Fig. 3). Las secuencias de péptidos fueron identificadas a partir de espectros de masas en tándem mediante el uso de búsquedas Mascot basados en la probabilidad de la base de datos IPI humana (Métodos). Al llevar a cabo búsquedas simultáneas de los datos contra una base de datos de señuelo que contienen secuencias de proteína reversa, y las identificaciones de rechazo (falsas) de

los espectros que coincidían con las secuencias de suero, así como con exclusión de las proteínas identificadas en la base de péptidos individuales, los inventores fueron capaces de lograr una frecuencia de identificación de proteínas positivas aparente falsa de menos de 1%. El número medio de péptidos únicos por proteína identificada fue de 10.

5 Como resultado, los inventores identificaron con alto grado de precisión [12], 126 péptidos únicos, correspondientes a 2,362 proteínas. Estas proteínas incluyen 891 proteínas identificadas en un estudio de alta precisión antes del proteoma urinario humano [13], y más de 1,000 proteínas adicionales identificadas por primera vez (Fig. 4). Estos datos se proporcionan como archivos adicionales, y se puede acceder públicamente desde el servidor de los inventores (en la World Wide Web de "childrenshospital.org/research/steenlab").

Origen del proteoma urinario humano

10 La composición de los proteomas identificados se caracterizó con respecto a la función biológica anotada Gene Ontology (GO), origen físico aparente, y la expresión tisular pronosticada. En comparación con toda la lista de entradas IPI, el análisis de función biológica anotada GO reveló la saturación de los componentes celulares tales como el citoplasma, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, y la membrana plasmática. Las proteínas del núcleo eran relativamente poco representadas, en consonancia con la ausencia general de las células intactas en la orina humana. Al igual que en [13], los inventores observaron un enriquecimiento relativo de hidrolasas, peptidasas, carbohidratos y proteínas de unión a lípidos, y una subrepresentación relativa de las proteínas de unión a ácidos nucleicos.

20 Al comparar si las proteínas identificadas sedimentadas en las fracciones de 17,000 g frente a 210,000 g de ultracentrifugación, fueron adsorbidos en la resina de intercambio iónico de exclusión de tamaño o se precipitaron con TCA, los inventores los definieron como complejos grandes o pequeños, y péptidos o proteínas solubles, respectivamente. Las fracciones de las proteínas identificadas de forma única a partir de estos estados físicos fueron 14, 20, 3 y 9%, respectivamente, lo que demuestra la existencia de proteínas individuales o sus variantes en diversos estados físicos. Por ejemplo, los componentes de los exosomas urinarios, incluyendo el complejo de clasificación endosomal (ESCRT-I), BRO1/ALIX, y VPS4, se detectaron como ambos complejos pequeños y proteínas solubles. Del mismo modo, las proteínas de unión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP), que son las hormonas circulantes de bajo peso molecular se detectaron como proteínas solubles, péptidos, y en los complejos pequeños. Aunque la fracción de intercambio iónico de exclusión molecular contribuyó sólo el 3% al total de la identificación de proteínas únicas, se enriquece sustancialmente de moléculas significativas biomedicamente que no serían detectados de otro modo, incluyendo las hormonas circulantes, tales como hepcidina y cromogranina [22, 23], y despojó moléculas de la superficie celular tales como Ly-6 y glicoproteínas de plaquetas [24, 25].

35 Los inventores evaluaron el origen del tejido probable del proteoma identificado por comparación con los atlas de expresión tisular publicados. Como era de esperar, el 90% de las proteínas detectadas en el proteoma urinario tienen perfiles de expresión de tejido que incluyen órganos del tracto urogenital, tales como los riñones y la vejiga, de los que probablemente se originan. Además de estos órganos proximales, el proteoma urinario contiene un número considerable de proteínas que parecen originarse a partir de tejidos distales. Entre ellos se encuentran 336 proteínas que se expresan únicamente en los tejidos distales tales como el sistema nervioso, el corazón y vasculatura, pulmón, sangre y médula ósea, hígado y otras vísceras intra-abdominal, lo que sugiere que se forma una parte sustancial del proteoma urinario como resultado de su circulación sistémica y filtración de suero. Por ejemplo, el proteoma urinario incluye Nogo/reticulon que está implicado en la regulación del crecimiento de las neuritas y se expresa en el sistema nervioso, pero no el tracto urogenital [26]. Del mismo modo, el proteoma urinario incluye angiopoyetina-2, que participan en la angiogénesis y homeostasis vascular, y se expresa por el endotelio vascular [27].

Proteomas urinarios individuales

45 En virtud de estudiar proteomas urinarios individuales, los inventores evaluaron el grado de similitudes y diferencias entre ellos. Para las 12 muestras estudiados en este ejemplo, los inventores detectaron $1,124 \pm 292$ (media \pm desviación estándar) proteínas por proteoma individual, con la concordancia promedio de 68%, calculado sobre todas las comparaciones binarias. Proteínas muy abundantes comunes a todos los proteomas individuales incluyen moléculas implicadas en el tráfico de retículo endoplásmico (uromodulina, cubilina, y megalina (LRP2)), enzimas filtradas de suero y portadores (bikunina (AMBP), aminopeptidasa N, ceruloplasmina, apolipoproteínas, e inmunoglobulinas), componentes estructurales extracelulares (perlecan, proteína ácida fibrilar glial), así como una variedad de otras moléculas secretadas tales como CD44, tetraspanin, y proteínas de membrana lisosomales asociadas (LAMPs). Muchos de éstos se han detectado en la orina humana con anterioridad, y muchos fueron identificados por primera vez. Ejemplos de estos últimos incluyen claudin, un regulador de uniones estrechas que participan en el mantenimiento de integridad glomerular y tubular [28], collectrin, un homólogo nuevo carboxipeptidasa relacionado con la enzima de conversión de la angiotensina implicado en la insuficiencia renal y la patogénesis de la enfermedad poliquística renal [29], SLC5A2, un transportador de sodio-glucosa tubular que provoca la glucosuria renal autosómica recesiva cuando es defectuoso [30], y otras numerosas proteínas con funciones poco conocidas como peplín y factor trébol 2.

En gran parte, la variabilidad observada entre los proteomas individuales parece ser de origen multifactorial, como lo sugiere la distribución multimodal de los coeficientes de variación de la aparente detectabilidad proteínicas, como se mide mediante recuento espectral [31] (Fig. 5; proteínas representativas están marcadas). Las proteínas con alto grado de variabilidad aparente incluyen factores del complemento, α 1-anti-tripsina, inhibidor de la proteína C, galectina (LGALS3BP), CD59, CD14, α -enolasa, α 2-macroglobulina, gelsolina, haptoglobina, hemopexina, intelectin, fibrinógeno, arilsulfatasa, suero amiloide A2, cistatina C, angiotensina, y resistina, entre otras. Muchas de estas proteínas son componentes de la respuesta de fase aguda [32], en consonancia con la colección de algunas de las muestras estudiadas de pacientes con dolor abdominal agudo. Otras diferencias entre los proteomas incluyen componentes de las proteínas de fluidos seminales y otras proteínas específicas del sexo, como semenogelina.

10 Proteómica de orina para el perfilado de las enfermedades humanas

Los inventores anotan las proteínas urinarias identificadas con respecto a las posibles asociaciones con enfermedades humanas mediante el uso de aprendizaje automático y minería de texto de los resúmenes de Medline. Las anotaciones identificadas para 26 comunes y más de 200 enfermedades raras examinadas están disponibles en documentos de hipertexto (archivos adicionales, <http://www.childrenshospital.org/investigación/steenlab>), con enlaces a información sobre las proteínas identificadas y estudios originales acerca de su papel en la enfermedad. Incluyen enfermedades renales comunes, tales como síndrome nefrótico (72 proteínas) y nefritis (139), enfermedades sistémicas, tales como sepsis (42), enfermedades de los órganos distales como neumonía (34), meningitis (22), y colitis (45). Además, el proteoma fue anotado con respecto a más de 500 enfermedades raras, incluidas las enfermedades de almacenamiento tales como la enfermedad de Niemann-Pick, trastornos del sistema inmunitario tales como el síndrome de Wiskott-Aldrich, y las enfermedades del sistema nervioso tales como ataxia espino-cerebelosa. Estas asociaciones se pueden usar para desarrollar pruebas de diagnóstico o nuevos enfoques para el estudio y el seguimiento de la progresión de la enfermedad.

Las referencias citadas por el número entre paréntesis, es decir, "(#)" en el Ejemplo 1 se citan a continuación.

- 25 1. NL Anderson, NG Anderson: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1:845-67.
2. JN Adkins, SM Varnum, KJ Auberry, RJ Moore, NH Angell, RD Smith, DL Springer, JG Pounds: Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1:947-55.
- 30 3. J Stahl-Zeng, V Lange, R Ossola, K Eckhardt, W Krek, R Aebersold, B Domon: High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6:1809-17.
4. H Keshishian, T Addona, M Burgess, E Kuhn, SA Carr: Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6:2212-29.
- 35 5. RP Woroniecki, TN Orlova, N Mendeleev, IF Shatat, SM Hailpern, FJ Kaskel, MS Goligorsky, E O'Riordan: Urinary proteome of steroid-sensitive and steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol* 2006, 26:258-67.
6. WS Oetting, TB Rogers, TP Krick, AJ Matas, HN Ibrahim: Urinary beta2-microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2006, 47:898-904.
7. RP Berger, PM Kochanek: Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: A preliminary study. *Pediatr Crit Care Med* 2006, 7:557-61.
- 40 8. A Propst, T Propst, M Herold, W Vogel, G Judmaier: Interleukin-1 receptor antagonist in differential diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995, 7:1031-6.
9. CB Laurell: Composition and variation of the gel electrophoretic fractions of plasma, cerebrospinal fluid and urine. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1972, 124:7 1-82.
- 45 10. T Pisitkun, RF Shen, MA Knepper: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci US A* 2004, 101:13368-73.
11. W Sun, F Li, S Wu, X Wang, D Zheng, J Wang, Y Gao: Human urine proteome analysis by three separation approaches. *Proteomics* 2005, 5:4994-5001.
12. T Pisitkun, R Johnstone, MA Knepper: Discovery of appendicitis biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2006.

13. J Adachi, C Kumar, Y Zhang, JV Olsen, M Mann: The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* 2006, 7:R80.
14. AZ Traum, MP Wells, M Aivado, TA Libermann, MF Ramoni, AD Schachter: SELDI-TOF MS of quadruplicate urine and serum samples to evaluate changes related to storage conditions. *Proteomics* 2006, 6:1676-80.
- 5 15. H Zhou, PS Yuen, T Pisitkun, PA Gonzales, H Yasuda, JW Dear, P Gross, MA Knepper, RA Star: Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006, 69:1471-6.
16. RS Lee, F Monigatti, AC Briscoe, Z Waldon, MR Freeman, H Steen: Optimizing Sample Handling for Urinary Proteomics. *J Proteome Res* 2008, 7:4022-4030.
- 10 17. C Renard, O Chappey, MP Wautier, M Nagashima, E Lundh, J Morser, L Zhao, AM Schmidt, JM Scherrmann, JL Wautier: Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Mol Pharmacol* 1997, 52:54-62.
18. KP Gudehithlu, AA Pegoraro, G Dunea, JA Arruda, AK Singh: Degradation of albumin by the renal proximal tubule cells and the subsequent fate of its fragments. *Kidney Int* 2004, 65:2113-22.
- 15 19. N Cindik, E Baskin, PI Agras, ST Kinik, M Turan, U Saatci: Effect of obesity on inflammatory markers and renal functions. *Acta Paediatr* 2005, 94:1732-7.
20. EF De Palo, R Gatti, F Lancerin, E Cappellin, A Sartorio, P Spinella: The measurement of insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration in random urine samples. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40:574-8.
- 20 21. AM Skinner, PE Clayton, DA Price, GM Addison, CY Mui: Variability in the urinary excretion of growth hormone in children: a comparison with other urinary proteins. *J Endocrinol* 1993, 138:337-43.
22. E Nemeth, MS Tuttle, J Powelson, MB Vaughn, A Donovan, DM Ward, T Ganz, J Kaplan: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004, 306:2090-3.
23. KB Helle, A Corti, MH Metz-Boutigue, B Tota: The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:2863-86.
- 25 24. DL Pflugh, SE Maher, AL Bothwell: Ly-6 superfamily members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I recognize two potential ligands expressed by B lymphocytes. *J Immunol* 2002, 169:5130-6.
25. D Varga-Szabo, I Pleines, B Nieswandt: Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28:403-12.
- 30 26. R Yan, Q Shi, X Hu, X Zhou: Reticulon proteins: emerging players in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63:877-89.
27. T Hato, M Tabata, Y Oike: The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2008, 18:6-14.
28. S Angelow, AS Yu: Claudins and paracellular transport: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007, 16:459-64.
- 35 29. Y Zhang, J Wada: Collectrin, a homologue of ACE2, its transcriptional control and functional perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 363:1-5.
30. EM Wright: Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 280:F10-8.
31. PC Carvalho, J Hewel, VC Barbosa, JR Yates, 3rd: Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res* 2008, 7:342-56.
- 40 32. RF Ritchie, GE Palomaki, LM Neveux, O Navolotskaia, TB Ledue, WY Craig: Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha₁-acid glycoprotein (orosomucoid), alpha₁-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal* 2000, 14:284-92.
33. P Vadas, M Gold, B Perelman, GM Liss, G Lack, T Blyth, FE Simons, KJ Simons, D Cass, J Yeung: Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 2008, 358:28-35.

34. JS Sanders, H van Goor, R Hanemaaijer, CG Kallenberg, CA Stegeman: Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19:1412–9.
35. EH Schuchman: The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann–Pick disease. *J Inher Metab Dis* 2007, 30:654–63.
- 5 36. A Kentsis, YY Lin, K Kurek, M Colicchio, YY Wang, F Monigatti, F Campagne, BH Horwitz, H Steen, RG Bachur: Discovery and validation of urine markers of acute appendicitis using high accuracy mass spectrometry. Submitted 2008.
37. JE Elias, SP Gygi: Target–decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 2007, 4:207–14.
- 10 38. VA McKusick: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders, 12 edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1998.
39. KC Dorff, MJ Wood, F Campagne: Breaking and fixing BM25 scoring with query expansion, a biologically inspired double mutant recovery experiment. In: *TREC*; 2006; Gaithersburg, MD, USA. 836–850.
40. F Campagne: Objective and automated protocols for the evaluation of biomedical search engines using No Title Evaluation protocols. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:132.

15 Ejemplo 2

La apendicitis es una de las muchas enfermedades humanas, para las que el diagnóstico se complica por la heterogeneidad de su presentación clínica y la escasez de marcadores de diagnóstico. Como tal, sigue siendo la emergencia quirúrgica más común de los niños, con una precisión del diagnóstico inicial, además, desafío a causa de síntomas no específicos pero similares de muchas otras afecciones de la infancia (1). Los retrasos en el diagnóstico preciso conducen a un aumento de mortalidad, morbilidad y costos asociados con las complicaciones de la apendicitis.

20

El uso de la tomografía computarizada de alta resolución (CT) para identificar la inflamación apendicular se espera que mejore tanto el diagnóstico como el tratamiento de la apendicitis aguda. Aunque variables, estas mejoras han sido modestas en el mejor de los casos, con tasas de apendicectomías innecesarias y rupturas de 3–30% y 30–45%, respectivamente (2–4). Además, la disponibilidad y experiencia con CT limitan la utilidad de este enfoque. Además, recientemente su uso se ha reevaluado debido a las preocupaciones de riesgo de cáncer (5).

25

Por lo tanto, diversos estudios intentaron identificar marcadores de laboratorio de apendicitis aguda, mediante el estudio de los dos marcadores de la respuesta de fase aguda, así como los mediadores inflamatorios específicos. El rendimiento de ambos parecía estar limitado (6–11), probablemente debido a los mecanismos no específicos y no relacionados de su elevación durante apendicitis aguda que se caracteriza específicamente por la infiltración de neutrófilos y la liberación de citoquinas distintas (12, 13).

30

Como se describe en este documento, los inventores utilizando un enfoque imparcial, han perfilado las alteraciones moleculares en una escala proteómica, incluyendo moléculas que están siendo secretadas localmente por los mismos tejidos enfermos o que se producen por vía sistémica en respuesta a la enfermedad local. Los inventores han identificado diversos marcadores urinarios de la apendicitis. Dado que la orina es abundante, obtenida con frecuencia y de forma no invasiva, y como resultado de ser un filtrado de suero, es relativamente simple en su composición, los inventores han descubierto marcadores urinarios para el uso en un método sencillo y rápido para identificar un sujeto con apendicitis.

35

Recientemente, la espectrometría de masas avanzada (MS) se ha utilizado eficazmente para descubrir la composición de proteínas de la orina humana, (14–16) y para identificar marcadores de enfermedades que afectan al riñón (17) y el tracto urogenital (18). Del mismo modo, los estudios de MS de orina se han utilizado para estudiar las proteínas producidas por los órganos distales tales como el cerebro (19) y el intestino, (20) y relacionarlos a la lesión cerebral y la enfermedad inflamatoria del intestino, respectivamente.

40

En este documento, los inventores demuestran el uso de perfiles de proteoma urinario y han descubierto marcadores urinarios de apendicitis aguda. Mediante el uso de espectrometría de masas de alta precisión, los inventores identificaron más de 2,000 proteínas únicas en las muestras de orina recogidas de manera rutinaria a niños y adultos jóvenes evaluados para el dolor abdominal agudo en el departamento de emergencia (ED). Las comparaciones estadísticas de proteomas urinarios individuales, predicción de la clase de reconocimiento de patrones y perfiles de expresión génica de apéndices enfermas se utilizaron para descubrir marcadores de diagnóstico. Al llevar a cabo un estudio ciego, prospectivo de estos marcadores, los inventores evaluaron su desempeño de diagnóstico.

45

Métodos utilizados en el Ejemplo 2

Estudio de la población. Los inventores estudiaron 67 niños y adultos jóvenes que acudieron al ED con sospecha de apendicitis aguda. Los pacientes fueron excluidos si tenían enfermedad autoinmune, neoplásica, renal o urológica preexistente o estaban embarazadas. Se recogió la orina como muestra limpia, las muestras en medio de la corriente como parte de la evaluación ED rutinaria de dolor abdominal. Las muestras de control intra-individuales adicionales se obtuvieron de pacientes seleccionados con apendicitis después de someterse a apendicectomías. Se obtuvo el consentimiento informado previo al conocimiento del diagnóstico final y el resto de la orina en el laboratorio se recuperó y se almacenó a -80°C dentro de las 6 horas de la recogida. El número esperado de los pacientes se calculó mediante la prueba de Pearson 2 para detectar una diferencia en un nivel de significación estadística de dos caras de 5% y la potencia de 90% que requiere 6 pacientes en cada grupo, suponiendo que 80% de las muestras positivas (5 pacientes) contendrían al menos una proteína única de la apendicitis en comparación con el grupo sin apendicitis (21). Este estudio fue aprobado por Children's Hospital Boston Committee on Clinical Investigation, comenzó en noviembre de 2006 y terminó en mayo de 2008.

Descubrimiento de perfiles de proteoma urinario y validación de espectrometría de masas dirigida. Para el descubrimiento de marcadores, se descongelaron alícuotas de 10 mL de orina se fraccionaron utilizando ultracentrifugación, cromatografía de intercambio catiónico, precipitación de proteínas, electroforesis en gel de poliacrilamida, y cromatografía líquida de fase reversa. Su composición de proteína se descubrió mediante el uso de cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un sistema de HPLC con nanoflujo (Eksigent) acoplado a un espectrómetro de masas de iones lineal híbrido trap-Orbitrap (LTQ-Orbitrap) (Thermo Scientific). El LTQOrbitrap permite una combinación sin precedentes de alta sensibilidad de detección en el rango attomolar ($10-18\text{ M}$), y de alta exactitud de la masa de menos de 2 partes por millón (0.001 Da para un péptido típico 500 Da), como se describe en detalle en el manuscrito acompañante (22). La validación de los marcadores se realizó utilizando alícuotas de 1 mL de muestras codificadas que fueron cegadas para el resultado final. Todo el procedimiento experimental se esquematiza en la figura 7.

Análisis. Los marcadores de orina fueron calificados por el cálculo de las proporciones relativas de enriquecimiento (RER) de detección de apendicitis frente a los grupos sin apendicitis sumando recuentos espectrales de proteínas individuales normalizados con los recuentos espectrales de la albúmina para dar cuenta de las pequeñas diferencias en la abundancia de proteínas totales, (23), donde el $\text{RER} = (\text{apendicitis}) \sum C_p / C_a / (\text{sin apendicitis}) \sum C_p / C_a$, con C_p y C_a designando los recuentos espectrales de los marcadores de proteínas y albúmina, respectivamente. Los marcadores urinarios fueron adicionalmente calificados por la evaluación de la prevalencia de su detección entre diferentes muestras mediante el uso de un parámetro de uniformidad (U), que se calcula dividiendo el número de casos de apendicitis en las que se detectaron por el número total de casos de apendicitis. Los marcadores urinarios se filtraron para tener $U > 0.7$ y $\text{RER} > 5$ para identificar los que fueron detectados de forma variable o insuficientemente enriquecido, respectivamente. El análisis de máquinas de vectores de soporte y la comparación de los marcadores de proteína en la orina con perfiles de expresión de genes del tejido de los apéndices enfermos se realizaron como se describe en este documento. Este último se basa en un estudio previo (24). Las características de funcionamiento del receptor se calcularon utilizando métodos estándar.

Mediciones resultantes. El diagnóstico final fue determinado por la presencia o ausencia de apendicitis en el examen macroscópico e histológico. Todas las muestras de apendicectomía fueron revisadas por un patólogo clínico, y sus asignaciones de la enfermedad fueron confirmados por un estudio independiente, ciego. Un paciente con apendicitis perforada fue sometido a una apendicectomía, y no se incluyó en la revisión histológica. Evaluación de la gravedad histológica de apendicitis hecho por la clasificación de las muestras por tener: sin cambios inflamatorios (normal); focos de infiltración de neutrófilos en la mucosa o en la pared (focal); infiltración transmural dispersa (leve); infiltración transmural densa, con deformación de los tejidos (moderada); infiltración transmural densa con necrosis de tejido o perforación de la pared (grave). Para los pacientes que no fueron sometidos a apendicectomías, el resultado fue confirmado por teléfono 6-8 semanas después de la evaluación ED. Todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron un resultado final.

Inmunohistoquímica de tejidos e inmunotransferencia de orina. La tinción inmunohistoquímica de apéndices embebidos en parafina, fijados con formalina fijo, se realizó utilizando una dilución 1:750 de anticuerpo policlonal anti-LRG de conejo (Atlas Antibodies), kit de detección OmniMap DAB anti-rabbit HRP y la plataforma de procesamiento de portaobjetos automatizado Ventana Discovery XT, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ventana Medical Systems). La especificidad de tinción fue confirmada mediante el uso de hígado y músculo como los controles positivos y negativos, respectivamente (datos no mostrados).

Para la inmunotransferencia de la orina, las muestras se precipitaron y se resolvieron por SDS-PAGE como se describe para espectrometría de masas dirigida. La transferencia Western se realiza ciega al resultado final, como se describe anteriormente (25), utilizando una dilución 1:2000 del anticuerpo policlonal anti-LRG de conejo, y el reactivo

quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo). La igualdad de carga de proteína total se evaluó por tinción con Coomassie (22).

Resultados

Población de estudio

- 5 En el curso de 18 mes de este estudio, 67 pacientes fueron inscritos que se presentaron al departamento de emergencia (ED) y se sometieron a la evaluación para una posible apendicitis aguda. De acuerdo con estudios anteriores de la epidemiología y la presentación de la apendicitis aguda en urgencias pediátricas, la edad media de nuestra población de estudio fue de 11 años, con la presentación de signos y síntomas que se describen en la Tabla 2. Veinticinco pacientes (37%) recibieron un diagnóstico final de apendicitis. Todos los pacientes con apendicitis fueron sometidos a apendicectomías, el 16% de los cuales se encontró que tenían una perforación. se encontró pacientes (4%) que recibieron un diagnóstico preoperatorio de apendicitis que no tenía ninguna evidencia histológica grave o de apendicitis tras ser sometidos a una apendicectomía. Veinte y cuatro por ciento de los pacientes se encontró que no tienen una causa específica de su dolor abdominal, con el resto de pacientes encontró que tenía una variedad de afecciones que imitan comunes y raras (Tabla 3).
- 10
- 15 Tabla 2: Presentación de los signos, síntomas y estudios de diagnóstico de 67 pacientes con dolor abdominal agudo. Los valores se expresan como desviación estándar media, cuando sea apropiado. RLQ (cuadrante inferior derecho), US (ultrasonido), CT (tomografía computarizada).

	Diagnóstico final	
	Apendicitis	No apendicitis
Número	25	42
Sexo (% hombres)	56	40
Edad (años)	11 + 3.5	11 ± 4.2
Duración de los síntomas (días)	2.7 ± 2.0	2.2 ± 1.7
Náuseas o vómitos (%)	72	52
Fiebre (%)	52	48
Migración del dolor (%)	36	14
Dolor o sensibilidad RLQ (%)	100	95
Temperatura de atención (°C)	36.9 ± 0.6	36.6 ± 0.9
Recuento periférico de glóbulos blancos (células K/mm ³)	15.7 ± 5.2	11.0 ± 6.4
Recuento absoluto de neutrófilos (células K/mm ³)	12.8 ± 5.4	8.5 ± 6.6
Imagen de US (%)	88	74
Diagnóstico de apendicitis US (%)	64	0
Imagen CT (%)	60	64
Diagnóstico de apendicitis CT (%)	93	7.4

Tabla 3. Diagnóstico final de los 67 pacientes del estudio

	Número de pacientes

Apendicitis	25
Dolor abdominal no específico	16
	Número de pacientes
Quiste ovárico o torsión	5
Estreñimiento	5
Pielonefritis o infección del tracto urinario	5
Cálculos renales	2
Adenitis mesentérica	2
Gastroenteritis o gastritis	2
Influenza o fiebre escarlata	2
Intususcepción	1
Enfermedad inflamatoria intestinal	1
Diverticulitis	1

5 El descubrimiento de marcadores de diagnóstico mediante el uso de marcadores de orina de perfiles proteómicos de orina de la apendicitis se identificaron en el análisis de 12 muestras, recogidas en el inicio del estudio, y se distribuyeron por igual entre pacientes con y sin apendicitis. La Tabla 4 enumeran los 32 marcadores, identificados por la clasificación de sus ratios de enriquecimiento relativo (RER). Estas proteínas incluyen componentes conocidos de la respuesta de fase aguda, tales como α -1-glicoproteína ácida (orosomucoide), plasminógeno, anhidrasa carbónica, enzima convertidora de angiotensina, y proteína de unión a lipopolisacárido, consistente con la respuesta inflamatoria sistémica que acompaña a apendicitis aguda.

10 Tabla 4: proteínas marcadoras de orina identificadas mediante análisis de la relación enriquecimiento relativo. † valores de U = 1 indican marcadores detectados en todas las muestras de apendicitis, mientras que los valores de relación de enriquecimiento relativo (RER) = 1 indican marcadores que no presentan enriquecimiento aparente en la apendicitis en comparación con los grupos sin apendicitis. N/A (no detectado) identifica marcadores no detectados en muestras no apendicitis). (* Índice Internacional de Proteínas (versión 3.36, en la World Wide Website de "ebi.ac.uk/IPI").)

Proteína	Número de acceso*	U†	RER†
Molécula de adhesión específica de adipocito	IPI00024929	1.0	18
α -2-glicoproteína rica en leucina	IPI00022417	1.0	9.5
Zinc- α -2-glicoproteína	IPI00 166729	1.0	7.3
α -1-glicoproteína ácida 2	IPI00020091	1.0	5.8
MLKL	IPI00180781	1.0	5.5
α -1-glicoproteína ácida 1	IPI00022429	1.0	5.3
Plasminógeno	IPI00019580	1.0	5.1
Anhidrasa carbónica 1	IPI002 15983	0.8	15

Enzima convertidora de angiotensina 2	IPI00465 187	0.8	12
Nicastrina	IPI00021983	0.8	12
Proteína	Número de acceso*	U [†]	RER [†]
Proteína de unión a lipopolisacárido	IPI00032311	0.8	11
Proteína	Número de acceso*	U [†]	RER [†]
Molécula de adhesión vascular 1	IPI00018 136	0.8	10
Proteína de interacción PDZK1 1	IPI0001 1858	0.8	7.5
SLC9A3	IPI00011184	0.8	7.5
Receptor hialuronano endotelial de vaso linfático 1	IPI00290856	0.8	6.9
FXR2	IPI000 16250	0.7	N/A
SORBS 1	IPI00002491	0.7	N/A
SLC4A1	IPI00022361	0.7	44
PRIC285	IPI00249305	0.7	14.9
TGFbeta2R	IPI00383479	0.7	11.3
SLC2A1	IPI00220194	0.7	10.7
Rcl	IPI00007926	0.7	9.7
VA0D1	IPI00034159	0.7	8.9
SLC13A3	IPI00103426	0.7	7.8
TTYH3	IPI00749429	0.7	7.3
SPRX2	IPI00004446	0.7	6.4
BAZ1B	IPI00216695	0.7	6.1
β-1,3-galactosiltransferasa	IPI00032034	0.7	6.1
Cromogranina A	IPI00383975	0.7	5.9
Proteína nueva	IPI00550644	0.7	5.5
SLC2A2	IPI00003905	0.7	5.2
FBLN7	IPI00167710	0.7	5.1

5

Los marcadores también incluyen un número de proteínas de adhesión celular tales como adipocitos molécula de adhesión específica, un componente de la epiteliales y endoteliales uniones estrechas, α-2-glucoproteína rica en leucina (LRG), un marcador de la diferenciación de neutrófilos implicada en tráfico de células, molécula de adhesión vascular 1, que media la adhesión de linfocitos-endotelial, y receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático involucrado en la migración celular, consistente con los hallazgos anteriores de tráfico de leucocitos y la infiltración en el tejido de la mucosa que acompaña a la apendicitis aguda.

5 El resto de marcadores superiores de la graduación no parecen compartir similitudes estructurales o funcionales conocidas, aunque algunos de ellos tales como β -1,3-galactosiltransferasa y VA0D1 han demostrado que funcionan específicamente en el epitelio del colon, y, por lo tanto, pueden incluir componentes de la respuesta de apendicitis local y sistémica. Los marcadores adicionales fueron identificados mediante el uso de aprendizaje de máquinas de vectores soporte (SVM), así como comparaciones con los perfiles de expresión génica del tejido de apéndices enfermos (Tablas 6 y 7). En total, se identificaron 49 marcadores.

Tabla 6. Proteínas marcadoras de orina identificadas utilizando análisis de SVM

Proteína	Número de acceso
Proteína A amiloide sérica	IPI00552578
α -1-antiquimotripsina	IPI00550991
Supervillin	IPI00412650
Lectina serina proteasa unida a manano 2	IPI00306378
Inhibidor de la inter- α -tripsina	IPI00218192
VIP36	IPI00009950
Prostaglandina-H2 D-isomerasa	IPI00013179
α -1-glucoproteína ácida 2	IPI00020091
AMBP	IPI00022426
α -1-glucoproteína ácida 1	IPI00022429
CD14	IPI00029260
Hemoglobina α	IPI00410714
Apolipoproteína D	IPI00006662
Hemoglobina β	IPI00654755
Glucoproteína rica en leucina	IPI00022417
Zinc- α -2-glucoproteína	IPI00166729

10 Tabla 7. Proteínas marcadoras de orina identificadas por comparaciones con la sobreexpresión de genes de tejido correspondiente. * De Murphy CG, et al. Mucosa Immunol. 2008; 1: 297-308.

Proteína	Número de Acceso	ID del gen Affymetrix*	Sobreexpresión del gen plegado*
S100-A8	IPI00007047	214370_a	67
S100-A9	IPI00027462	203535_a	45
Proteína tipo amiloide 2	IPI00031030	214456_x_a	38
Versicano	IPI00009802	211571_s_a	11
SPRX2	IPI00004446	205499_a	8.1

α -1-glucoproteína ácida 1	IPI00022429	205041_s_a	7.8
Proteína antagonista del receptor de la interleucina-1	IPI00000045	212657_s_a	4.3
Receptor de ácido hialuronano endoteliales de los vasos linfático 1	IPI00290856	220037_s_a	2.0

Validación de los marcadores de proteínas en orina mediante el uso de espectrometría de masas dirigida

5 Con el fin de evaluar su rendimiento diagnóstico, los inventores determinaron sus concentraciones en la orina de todos los pacientes incluidos de forma prospectiva, con mediciones experimentales cegadas a los resultados de los pacientes. Proteínas detectadas con uniformidad suficiente entre las 67 muestras examinadas se enumeran en la Tabla 5. Las proteínas restantes se detectaron en menos de la mitad de las muestras, probablemente como resultado de diferencias en el procesamiento de las muestras de descubrimiento y validación. La comparación de las diferencias en la concentración urinaria entre los grupos de pacientes con apendicitis y sin apendicitis reveló LRG, S100-A8, y α -1-glucoproteína ácida 1 (orosomucoide) como exhibiendo enriquecimiento aparente sustancial en las orinas de pacientes con apendicitis (figura 8).

Tabla 5: Proteínas marcadoras de orina validadas por espectrometría de masas dirigida. ROC (característica operativa del receptor), AUC (área bajo la curva).

Proteína	AUC ROC	Intervalo de confianza del 95% AUC
α -glucoproteína rica en leucina (LRG)	0.97	0.93-1.0
Calgranulina A (S100-A8)	0.84	0.72-0.95
α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM)	0.84	0.72-0.95
Plasminógeno (PLG)	0.79	0.67-0.91
Lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2)	0.74	0.61-0.88
Zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1)	0.74	0.60-0.88
α -1-antiquimotripsina (SERPINA3)	0.84	0.73-0.94
Apolipoproteína D (ApoD)	0.53	0.38-0.69

15 En efecto, características operativas del receptor (ROC) para estos marcadores mostraron un rendimiento excelente, con LRG y S 100-A8 que tiene un área bajo los valores de curva (AUC) de 0.97 y 0.84, respectivamente (figura 9, Tabla 5). Otros marcadores validados prospectivamente con aparente buen rendimiento incluyen orosomucoide y α -1-antiquimotripsina (serpina A3); plasminógeno, lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2), zinc- α -2-glucoproteína (AZGP) mostró un rendimiento intermedio, y apolipoproteína D mostró rendimiento deficiente. Estos resultados son consistentes con la mayoría de estas proteínas que son componentes de la respuesta de fase aguda

20 general, durante las que pueden ser reguladas positivamente por una variedad de condiciones infecciosas e inflamatorias, incluyendo algunos que están representados en el grupo sin apendicitis (Tabla 3).

25 Los inventores evaluaron la relación entre aparente abundancia de proteínas de orina de marcadores y de la gravedad aparente de apendicitis mediante la clasificación de las muestras de apendicectomía con respecto al grado de infiltración de neutrófilos (12). Como puede verse de la figura 10, LRG parece ser un marcador de la apendicitis focal, mientras que S100-A8 parece ser un marcador de la enfermedad progresiva, alcanzando un nivel máximo con apendicitis moderado. Además de exhibir excelente rendimiento diagnóstico, LRG se detectó con fuerza en enfermos en comparación con apéndices normales mediante el uso de inmunohistoquímica de tejido (figura 10), consistente con su función biológica y su papel propuesto en la apendicitis. Su enriquecimiento en la orina de pacientes con apendicitis con respecto a aquellos con otras condiciones se confirmó mediante el uso de inmunotransferencia Western (figura 9B), lo

que demuestra que los inmunoensayos de diagnóstico clínico se puede utilizar como un método para identificar los marcadores urinarios descritos en este documento.

5 Como se describe en este documento, los inventores utilizaron perfiles de proteoma urinario para descubrir marcadores urinarios de apendicitis aguda. El uso de la captura exhaustiva de proteínas y fraccionamiento junto con una espectrometría de masas de alta precisión permitió a los inventores para detectar más de 2,000 proteínas únicas en las muestras de orina recogidas de manera rutinaria, que constituye la mayor y más completa caracterización de la composición de proteínas de la orina humana hasta la fecha (22). Los marcadores de diagnóstico urinario descubiertos (Tablas 4, 6, y 7) fueron validados posteriormente en un estudio prospectivo, estudio ciego de los niños con sospecha de tener apendicitis aguda, la identificación de diversos con el enriquecimiento estadísticamente significativo en la orina de los niños con apendicitis probada histológicamente en comparación con aquellos sin (Tabla 5).

15 El uso de CT de alta resolución y US ha llevado a mejoras sustanciales en el diagnóstico de apendicitis aguda, con respecto tanto a las tasas de complicaciones y apendicectomías innecesarias (2–4). Sin embargo, siguen existiendo importantes retos diagnósticos, en gran parte debido a la naturaleza no específica de los signos y síntomas de muchas condiciones que pueden imitar la apendicitis aguda. Del mismo modo, los hallazgos de CT y US con frecuencia pueden ser indeterminado o dudoso (26). Finalmente, la disponibilidad limitada y experiencia con protocolos CT dedicados para la apendicitis, así como el riesgo futuro de cáncer, a menudo pueden limitar su utilidad (5).

Numerosos estudios han tratado de identificar biomarcadores para ayudar al diagnóstico de apendicitis, con los niveles de recuento absoluto de neutrófilos en sangre y de proteína C reactiva en suero es más útil, pero todavía limitada con respecto a su sensibilidad y especificidad (27, 28).

20 Los recientes intentos para identificar nuevos y mejorados marcadores de diagnóstico, tales como CD44, interleucina-6, interleucina-8, y 5-hidroxi indol acetato, produce mejoras limitadas en comparación con las existentes (6–11), probablemente como resultado de estar estrechamente correlacionado con los marcadores existentes de la respuesta general de fase aguda, o no específicos para los distintos mecanismos inmunes que caracterizan la apendicitis aguda.

25 Al tomar ventaja de la última generación de espectrómetros de masas que combinan una alta precisión con una alta sensibilidad, y llevar a cabo exhaustiva captura de proteínas y fraccionamiento de las muestras de orina recogidas de manera rutinaria, los inventores desarrollaron un método que permite el descubrimiento imparcial y validación de múltiples marcadores de diagnóstico, superando así las limitaciones de los enfoques convencionales sobre la base de pruebas de hipótesis única. Debido a la profundidad del descubrimiento logrado, identificando más de 2,000 proteínas únicas en total, perfiles proteómicos de orina, como perfiles de expresión génica, puede ser susceptibles al sesgo de ruido y de selección. Con el fin de minimizar estos problemas potenciales (12), los descubrimientos de los proteomas de orina se compararon no sólo entre los pacientes con apendicitis probada histológicamente y los que no, pero también con los mismos pacientes después de que se recuperaron de apendicectomías, minimizando de esta manera las diferencias individuales debido a la edad, género, estado fisiológico o variación genética. Se utilizaron criterios de identificación de alta rigurosidad, eliminando esencialmente identificaciones falsas (22). El poder discriminatorio de los marcadores de diagnóstico se evaluó mediante el examen del nivel y la uniformidad de su enriquecimiento en pacientes con apendicitis (Tabla 4), mediante el uso de patrones de reconocimiento de algoritmos de aprendizaje de predicción de la clase (Tabla 6), y mediante la comparación de los marcadores de proteínas de orina descubiertos con los perfiles de la expresión génica de tejido de apéndices enfermos (Tabla 7) (24).

40 Como resultado, los 49 marcadores urinarios descubiertos constituyen una extensa caracterización de la respuesta molecular que acompaña a apendicitis aguda, incluyendo moléculas producidas tanto sistémica como localmente. Entre los primeros están los componentes conocidos de la respuesta de fase aguda, tales como orosomucoide, plasminógeno, enzima convertidora de angiotensina, anhidrasa carbónica, TGF β , proteína de unión a lipopolisacárido, suero amiloide A, α -1-antiquimotripsina, AMBP (bikunina), y lectina serina proteasa de unión a manano (2). Se han identificado numerosas moléculas de adhesión celular que pueden participar en la generación local de la respuesta inflamatoria sistémica o su localización en el tejido apendicular, incluyendo la molécula de adhesión vascular 1, receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático, molécula de adhesión específica a adipocitos, supervillin, CD14, y α -2-glucoproteína rica en leucina. Así mismo, diversos mediadores inflamatorios locales potenciales y citoquinas se identificaron tales como cromogranina A, galactosiltransferasa β -1,3-, interleucina-1 de proteína antagonista del receptor, y S 100-A8.

50 Los marcadores de diagnóstico urinario descubiertos fueron validados en su capacidad para diagnosticar con precisión la apendicitis aguda midiendo sus concentraciones urinarias en un estudio prospectivo y ciego de 67 pacientes que fueron sospechosos de tener apendicitis aguda, con el diagnóstico final verificado por el examen histológico ciego de apéndices removidos. Siete marcadores fueron validados con éxito, incluyendo LRG, S100-A8, y ORM que mostró un excelente rendimiento diagnóstico (Figura 9, Tabla 5). El enriquecimiento de LRG en orina de pacientes con apendicitis se confirmó mediante el uso de inmunotransferencia Western (figura 9B), y su enriquecimiento en enfermos en comparación con apéndices normales se demostró mediante el uso de inmunohistoquímica de tejido (figura 10).

- LRG se expresa por diferenciación de neutrófilos, hígado y vénulas endoteliales altas del mesenterio, incluyendo el mesoapéndice, que funciona en la activación de leucocitos y la quimiotaxis, respectivamente (29, 30). Su enriquecimiento en la orina de pacientes con apendicitis aguda demuestra que puede ser derramada por los neutrófilos activados a nivel local y/o en sitios inflamatorios locales, tales como el mesoapéndice a través del cual es probable tráfico (figura 10). Como tal, es probable que un marcador específico de los procesos inflamatorios locales, tales como las que caracterizan específicamente apendicitis aguda, a diferencia de los marcadores generales de respuesta sistémica tal como los reactantes de fase aguda, y marcadores macroscópicos de la inflamación local, tales como los observados utilizando formación de imágenes US y CT.
- LRG parece ser enriquecido en la orina de pacientes con apendicitis en ausencia de cambios inflamatorios macroscópicos, como lo demuestra su diagnóstico preciso de la apendicitis de 2 pacientes que presentan hallazgos de formación de imágenes normales pero que tenían evidencia de la apendicitis aguda en el examen histológico, así como su diagnóstico preciso de la ausencia de apendicitis en un paciente sin evidencia histológica de la apendicitis, pero que fueron sometidos a apendicectomía como resultado de los hallazgos de la ampliación apendicular en la CT. Por último, LRG parece ser enriquecido en la orina de pacientes con pielonefritis, en consonancia con su papel propuesto en los procesos inflamatorios locales. En consecuencia, LRG será útil para el diagnóstico de apendicitis aguda después de descartar otras infecciones de los tejidos locales, tales como pielonefritis, abscesos y enfermedad inflamatoria pélvica (31). Es importante destacar que, LRG parece estar fuertemente expresado en los apéndices enfermos, lo que demuestra que puede ser la base de una vía principal de la inflamación apendicular mediante la localización o el mantenimiento de la infiltración neutrofílica local que caracteriza específicamente apendicitis aguda (12, 13, 24).
- Los inventores no han probado los marcadores de proteínas en orina de la apendicitis aguda en pacientes evaluados en los entornos que no sean el servicio de urgencias, así como en pacientes adultos mayores, que podrán incluir otras causas de dolor abdominal de los observados en el estudio de cohortes. La demostración de los inventores de los marcadores urinarios de apendicitis establece un paradigma útil para la identificación de otros marcadores urinarios clínicamente útiles de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades infecciosas, endocrinas, autoinmunes y neoplásicas.
- Las referencias citadas en el Ejemplo 2 y dados a conocer en cursiva entre paréntesis (i.e., "(#)") están por debajo.
1. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, Tauxe RV. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. *Am J Epidemiol* 1990; 132:910–25.
 2. Rao PM, Rhea JT, Novelline RA, Mostafavi AA, McCabe CJ. Effect of computed tomography of the appendix on treatment of patients and use of hospital resources. *N Engl J Med* 1998; 338:141–6.
 3. Peck J, Peck A, Peck C. The clinical role of noncontrast helical computed tomography in the diagnosis of acute appendicitis. *Am J Surg* 2000; 180:133–6.
 4. Partrick DA, Janik JE, Janik JS, Bensard DD, Karrer FM. Increased CT scan utilization does not improve the diagnostic accuracy of appendicitis in children. *J Pediatr Surg* 2003; 38:659–62.
 5. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography—an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med* 2007; 357:2277–84.
 6. Taha AS, Grant V, Kelly RW. Urinalysis for interleukin–8 in the non–invasive diagnosis of acute and chronic inflammatory diseases. *Postgrad Med J* 2003; 79: 159–63.
 7. Bolandparvaz S, Vasei M, Owji AA, et al. Urinary 5–hydroxy indole acetic acid as a test for early diagnosis of acute appendicitis. *Clin Biochem* 2004; 37:985–9.
 8. Apak S, Kazez A, Ozel SK, Ustundag B, Akpolat N, Kizirgil A. Spot urine 5–hydroxyindoleacetic acid levels in the early diagnosis of acute appendicitis. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1436–9.
 9. Rivera–Chavez FA, Peters–Hybki DL, Barber RC, et al. Innate immunity genes influence the severity of acute appendicitis. *Ann Surg* 2004; 240:269–77.
 10. Paajanen H, Mansikka A, Laato M, Ristamaki R, Pulkki K, Kostianen S. Novel serum inflammatory markers in acute appendicitis. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62:579–84.
 11. Kafetzis DA, Velissariou IM, Nikolaidis P, et al. Procalcitonin as a predictor of severe appendicitis in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24:484–7.

12. Tsuji M, Puri P, Reen DJ. Characterisation of the local inflammatory response in appendicitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16:43–8.
13. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, et al. Expression of interleukin–8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144:997–1007.
- 5 14. Rai AJ, Stemmer PM, Zhang Z, et al. Analysis of Human Proteome Organization
15. Plasma Proteome Project (HUPO PPP) reference specimens using surface enhanced laser desorption/ionizationtime of flight (SELDI–TOF) mass spectrometry: multi–institution correlation of spectra and identification of biomarkers. *Proteomics* 2005; 5:3467–74.
16. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of appendicitis biomarker s. *Mol Cell Proteomics* 2006.
- 10 17. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* 2006; 7:R80.
18. Woroniecki RP, Orlova TN, Mendeleev N, et al. Urinary proteome of steroid–sensitive and steroid–resistant idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Am J Nephrol* 2006; 26:258–67.
- 15 19. Oetting WS, Rogers TB, Krick TP, Matas AJ, Ibrahim HN. Urinary beta2– microglobulin is associated with acute renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2006; 47:898–904.
20. Berger RP, Kochanek PM. Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: A preliminary study. *Pediatr Crit Care Med* 2006; 7:557–61.
21. Propst A, Propst T, Herold M, Vogel W, Judmaier G. Interleukin–1 receptor antagonist in differential diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:1031–6.
- 20 22. Campbell MJ. Estimating sample sizes for binary, ordered categorical, and continuous outcomes in two group comparisons. *British Medical Journal* 1995; 3 11:1145–48.
23. Kentsis A, Monigatti F, Dorff K, Campagne F, Bachur RG, Steen H. Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. Submitted 2008.
- 25 24. Carvalho PC, Hewel J, Barbosa VC, Yates JR, 3rd. Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res* 2008; 7:342–56.
25. Murphy CG, Glickman JN, Tomczak K, et al. Acute Appendicitis is Characterized by a Uniform and Highly Selective Pattern of Inflammatory Gene Expression. *Mucosal Immunol* 2008; 1:297–308.
- 30 26. Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, Shao L, Borden KL. Ribavirin suppresses eIF4E–mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7–methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:18105–10.
27. Kharbanda AB, Taylor GA, Bachur RG. Suspected appendicitis in children: rectal and intravenous contrastenhanced versus intravenous contrast–enhanced CT. *Radiology* 2007; 243:520–6.
28. Okamoto T, Sano K, Ogasahara K. Receiver–operating characteristic analysis of leukocyte counts and serum C–reactive protein levels in children with advanced appendicitis. *Surg Today* 2006; 36:515–8.
- 35 29. Bundy DG, Byerley JS, Liles EA, Perrin EM, Katznelson J, Rice HE. Does this child have appendicitis? *Jama* 2007; 298:438–5 1.
30. O'Donnell LC, Druhan LJ, Avalos BR. Molecular characterization and expression analysis of leucine–rich alpha 2–glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 2002; 72:478–85.
31. Saito K, Tanaka T, Kanda H, et al. Gene expression profiling of mucosal
- 40 32. addressin cell adhesion molecule–1+ high endothelial venule cells (HEV) and identification of a leucine–rich HEV glycoprotein as a HEV marker. *J Immunol* 2002; 168:1050–9.
33. Bini L, Magi B, Marzocchi B, et al. Two–dimensional electrophoretic patterns of acute–phase human serum proteins in the course of bacterial and viral diseases. *Electrophoresis* 1996; 17:612–6.

Ejemplo 3

Descubrimiento y validación de los marcadores de orina de la apendicitis aguda mediante espectrometría de masas de alta precisión

Descubrimiento de marcadores de diagnóstico mediante el uso de los perfiles proteómicos de orina

5 Con el fin de identificar candidatos marcadores urinarios de apendicitis aguda, los inventores ensamblados en un conjunto de datos de proteoma urinario de descubrimiento, derivado del análisis de 12 muestras, sin ningún tipo de anomalías de análisis de orina clínicos, recogidos en el inicio del estudio, y se distribuye por igual entre los pacientes con y sin apendicitis. Seis de estas muestras se obtuvieron de pacientes que se encontró que tenían evidencia histológica de apendicitis (2 leve, moderada 3, 1 grave). Tres muestras se recogieron de pacientes sin apendicitis (1 con dolor abdominal inespecífico, 1 con estreñimiento, 1 con adenitis mesentérico). De los 3 pacientes con apendicitis, los inventores obtuvieron muestras de control adicionales en su rutina de evaluación post-quirúrgica 6–8 semanas después de someterse a apendicectomías, momento en el que estaban asintomáticos y en su estado de salud normal. Estas muestras se incluyeron en el análisis con el fin de minimizar el efecto potencial de la variabilidad individual en la composición urinaria que pueden surgir debido a la edad, sexo, estado fisiológico o posible variación genética.

15 La composición de proteoma urinario de estas 12 muestras se descubrió mediante el uso de captura de proteína y el fraccionamiento junto con una espectrometría de masas de alta precisión, como se describe en detalle en el estudio de acompañamiento, 1 y esquematizada en la figura 7. Como la orina es una mezcla compleja con abundantes proteínas tales como albúmina que oscurecen la detección de proteínas de menos concentradas, potencialmente de diagnóstico, tales como citoquinas secretadas y mediadores de la respuesta inflamatoria, los inventores diseñaron un método de fraccionamiento que reduce la complejidad de la mezcla mientras se minimiza la pérdida de material (figura 7).

20 Como resultado, los inventores fueron capaces de identificar 2,362 proteínas en las muestras de orina recogidas de manera rutinaria con la tasa aparente de identificaciones falsas de menos de 1%,¹ como se determina a partir de la búsqueda de base de datos señuelo.² Más de 1,200 proteínas identificadas no han sido detectados en los estudios anteriores proteómicos de orina, y más de 300 proteínas parecen ser filtrado a partir de suero y se expresa en los tejidos distales, incluyendo el intestino. Para el descubrimiento de marcadores de apendicitis candidato, los inventores aumentaron aún más la rigurosidad de identificaciones de péptidos a menos del 0.1% de identificaciones falsas, produciendo esencialmente sin identificación de proteínas falsas para proteínas identificadas sobre la base de múltiples péptidos. Por ejemplo, las proteínas identificadas en la base de 10 péptidos únicos (mediana para todo el conjunto de datos), tienen una frecuencia de error de identificación aproximada de 10–19.

30 Con el fin de identificar marcadores candidatos de apendicitis, los inventores aprovecharon la información cuantitativa proporcionada por espectrometría de masas en tándem mediante el registro del número de espectros de iones fragmento asignado a cada péptido precursor único, que son proporcionales a la abundancia de péptidos,³ y han sido utilizados para la cuantificación relativa de los componentes de mezclas complejas de proteínas.⁴ A pesar de que la composición y la concentración de la orina varía con el estado fisiológico, había menos de $10 \pm 10\%$ (media \pm desviación estándar) de diferencia en la abundancia de proteína total entre muestras individuales, similar a estudios anteriores de la orina de niños.^{5–7} Los recuentos espectrales individuales de proteínas, se calculan sumando los recuentos espectrales de péptidos únicos asignados a distintas proteínas, se normalizaron con respecto a los recuentos espectrales de la albúmina para dar cuenta de estas pequeñas diferencias en abundancia de proteínas totales.⁴

40 Con el fin de maximizar la profundidad de descubrimiento del marcador candidato, los inventores sometieron el descubrimiento proteoma urinario para aprendizaje de máquinas de vectores soporte (SVM) con el fin de identificar marcadores de orina candidatos que pueden ser enriquecidos como grupo, pero no necesariamente de forma individual, según sea necesario por el análisis relativo relación expresión (RER) anterior. Este enfoque se implementa en un programa de descubrimiento de biomarcadores BDVAL que utiliza validación cruzada para identificar biomarcadores predictivos (Fabien Campagne, unpublished results, at the World Wide Website of "icb.med.cornell.edu/wiki/index.phpBDVAL"), similar a métodos establecidos para descubrimiento de la clase de micromatriz.⁸ Debido al bajo número de muestras, los inventores llevaron a cabo la validación cruzada con cuatro pliegues, repitieron 5 veces con asignaciones aleatorias de plegado (12 muestras en total, 6 casos, 6 controles). En esta configuración, se entrenaron modelos de evaluación de 20 individuos (5 x 4). Cada modelo fue entrenado con un conjunto de 50 características (niveles normalizados de abundancia de proteínas). En cada división, que consta de 9 muestras de entrenamiento y 3 muestras de ensayo, una etapa de pre-filtrado prueba t de Student, se priorizaron hasta 400 características cuyo valor promedio difería la mayoría entre los casos y controles en el conjunto de entrenamiento. Las 400 características intermedias fueron calificadas por la disminución de peso de la máquina de vectores de soporte y las 50 mejores características fueron utilizadas para entrenar el modelo de evaluación (modelos fueron implementados como una máquina de vectores de soporte, implementado en libSVM con núcleo lineal, y parámetro de margen de $C=1$). Al final de la evaluación, se inspeccionaron las listas de características para determinar cuántas veces una determinada característica se ha utilizado en uno cualquiera de los 20 modelos de evaluación. Los inventores consideran

características para la validación sólo si se encuentran en al menos el 50% de los modelos de evaluación generados (10 modelos en este caso).

5 La Tabla 6 enumera 17 proteínas identificadas por análisis SVM, que incluyen diversas proteínas que se identificaron por análisis de RER, así como muchos de los que no lo eran, incluyendo los componentes adicionales de la respuesta de fase aguda, tales como suero amiloide A, α -1-antiquimotripsina, y bikunina (AMBP). En particular, la exclusión de las muestras de control recogidas de pacientes asintomáticos después de que fueron sometidos a apendicectomías aumentó el número de marcadores candidatos a 273 incluyendo, además, una variedad de proteínas con pocas probabilidades de estar relacionada con la respuesta de la apendicitis, tales como la tirosina quinasa universal Src, por ejemplo, lo que sugiere que factores variantes individualmente tales como las que influyen en la filtración de proteínas y la producción de orina pueden afectar significativamente a los estudios de descubrimiento de biomarcadores.

Validación de candidato de espectrometría de masas dirigida

15 Alícuotas de 1 mL de orina descongeladas se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético al 20% (p/v), y se incubaron las muestras durante 1 hora a 4°C. Los precipitados se sedimentaron a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C y los pellets se lavaron dos veces con acetona pura a 4°C, con acetona residual eliminada por secado al aire. Los pellets secos se resuspendieron en solución reguladora de Laemmli, se resolvieron por SDS-PAGE, se alquilaron y digirieron con tripsina como se describe.¹ A cada muestra, se le adicionaron 0.4 μ g de la proteína de unión de cadena simple (SSB) purificado a partir de *Escherichia coli* (USB) para servir como patrón de referencia. La nanoLC-MS/MS dirigida se llevó a cabo mediante el uso del espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap, utilizando los parámetros descritos,¹ pero operado en un modo de adquisición dependiente de lista de inclusión, buscando iones precursores detectados contra los valores m/z de los péptidos marcadores candidatos con una tolerancia de 0.05 Da, utilizando una lista de inclusión de masas y cargas de péptidos marcadores candidato, derivada del análisis de los proteomas de descubrimiento. Seis iones emparejados más intensas fueron fragmentados secuencialmente mediante el uso de disociación inducida por colisión, y los espectros de sus fragmentos se registraron en la trampa de iones lineal, con la exclusión dinámica de iones precursores ya seleccionados para MS/MS de 60 seg. Este tipo de enfoque es superior a los métodos de adquisición de datos convencionales dependientes, reduciendo al mínimo la detección de péptidos no dirigidos.⁹ Diferencias en la abundancia aparente de proteínas fueron normalizada en comparación a la adición exógena de referencia estándar SSB para explicar la variabilidad instrumental. La ausencia de SSB de muestras de orina sin su adición fue confirmada por la búsqueda de los datos frente a la base de datos de proteínas de *E. coli* (datos no mostrados).

20 Los espectros de masas grabados se procesaron y se identificaron, como se describe.¹ La precisión de la identificación de péptidos se evaluó mediante la búsqueda de base de datos señuelo,¹ forzando una tasa de descubrimiento de péptido falsa de menos de 1%, que corresponde a tasa de descubrimiento de proteínas falsa esencialmente cero, dado que todas las proteínas marcador de diagnóstico candidatos se identificaron sobre la base de al menos 9 péptidos, que corresponde a una frecuencia de identificación falsa aparente de menos de 10-18. Por ejemplo, se identificó α -2-glucoproteína rica en leucina (LRG) sobre la base de 55 péptidos únicos.

Marcadores urinarios de respuesta inflamatoria apendicular

40 Debido a que la apendicitis aguda se caracteriza por el aumento de la expresión de quimioatrayentes distintos en la mucosa del intestino,¹⁰ e infiltración específica de neutrófilos,¹¹ los inventores se preguntaron si los marcadores de la apendicitis aguda identificados a partir de los estudios de tejido apendicular se pueden detectar en la orina de pacientes con apendicitis. Con este fin, los inventores compararon los marcadores de proteínas de orina candidatos identificados por el uso de perfiles de proteoma urinario (Tabla 4) con marcadores de tejido identificados en un estudio diferente utilizando expresión génica de micromatriz para apéndices enfermos.¹² La figura 6 registra los valores RER de la 40 más uniformemente detectados ($U > 0.7$) marcadores de orina candidato como una función de la sobreexpresión de tejido de sus respectivos genes perfilados de micromatriz. De ellos, más del 50% muestran una correlación positiva entre la sobreexpresión de tejidos y de enriquecimiento de la orina (figura 6), demostrando que los perfiles de expresión de genes de tejidos son útiles para identificar marcadores de la enfermedad. Sin embargo, sólo 3 de los genes que se sobreexpresan en apéndices enfermos en comparación con normales también fueron identificados como marcadores candidatos por perfiles de proteoma urinario: SPRX2, receptor 1 del ácido hialurónico endotelial vascular linfático (LYVE1), y α -1-glucoproteína ácida 1 (orosomucoide 1), lo que demuestra que la detección de marcadores de la enfermedad local en la orina no sólo depende de la sobreexpresión del tejido, pero probablemente también requiere otros factores, tales como desprendimiento, circulación en la sangre, y acumulación en la orina. La Tabla 7 enumera los marcadores de proteína en la orina que se enriquecieron en muestras de orina de pacientes con apendicitis con los genes correspondientes que se sobreexpresan en apéndices enfermos.

55 En contraste con LRG que se expresa exclusivamente por el neutrófilos, hígado y mesenterio, S100-A8 es una citocina expresada por diversos tejidos, incluyendo una variedad de células endoteliales y epiteliales.^{13,14} Se regula positivamente específicamente en estados inflamatorios, incluyendo los procesos de la activación y la migración de

neutrófilos. Los resultados de su sobreexpresión en el tejido apendicular durante apendicitis aguda,¹² y el enriquecimiento en la orina de pacientes con apendicitis demuestran que como LRG, también es un marcador de la inflamación local, aunque su expresión en una amplia variedad de tejidos puede afectar a su especificidad de diagnóstico, de conformidad con su rango dinámico ligeramente reducida y el rendimiento en comparación con los de LRG (Tabla 5, figura 9). De acuerdo con lo anterior, se ha encontrado que se regula positivamente en una amplia variedad de condiciones, incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino,¹⁵ artritis,¹⁶ Kawasaki vasculitis,¹⁷ cáncer,¹⁸ y sepsis.¹⁹

Las referencias citadas en el Ejemplo 3 y se revelará como superíndice (i.e., "1") se enumeran a continuación.

- 10 1. Kentsis A, Monigatti F, Dorff K, Campagne F, Bachur RG, Steen H. Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. Submitted 2008.
2. Elias JE, Gygi SP. Target–decoy search strategy for increased confidence in large–scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 2007; 4:207–14.
3. Old WM, Meyer–Arendt K, Aveline–Wolf L, et al. Comparison of label–free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:1487–502.
- 15 4. Carvalho PC, Hewel J, Barbosa VC, Yates JR, 3rd. Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res* 2008; 7:342–56.
5. Cindik N, Baskin E, Agras PI, Kinik ST, Turan M, Saatci U. Effect of obesity on inflammatory markers and renal functions. *Acta Paediatr* 2005; 94:1732–7.
- 20 6. De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Sartorio A, Spinella P. The measurement of insulin–like growth factor–I (IGF–I) concentration in random urine samples. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:574–8.
7. Skinner AM, Clayton PE, Price DA, Addison GM, Mui CY. Variability in the urinary excretion of growth hormone in children: a comparison with other urinary proteins. *J Endocrinol* 1993; 138:337–43.
8. Radmacher MD, McShane LM, Simon R. A paradigm for class prediction using gene expression profiles. *J Comput Biol* 2002; 9:505–11.
- 25 9. Jaffe JD, Keshishian H, Chang B, Addona TA, Gillette MA, Carr SA. Accurate inclusion mass screening: a bridge from unbiased discovery to targeted assay development for biomarker verification. *Mol Cell Proteomics* 2008.
10. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, et al. Expression of interleukin–8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144:997–1007.
- 30 11. Tsuji M, Puri P, Reen DJ. Characterisation of the local inflammatory response in appendicitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16:43–8.
12. Murphy CG, Glickman JN, Tomczak K, et al. Acute Appendicitis is Characterized by a Uniform and Highly Selective Pattern of Inflammatory Gene Expression. *Mucosal Immunol* 2008; 1:297–308.
13. Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol* 1999; 66:549–56.
- 35 14. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81:28–37.
15. Fagerberg UL, Loof L, Lindholm J, Hansson LO, Finkel Y. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:414–20.
16. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, et al. Monomeric calgranulins measured by SELDI–TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem* 2008; 54:1066–75.
- 40 17. Hirono K, Foell D, Xing Y, et al. Expression of myeloid–related protein–8 and –14 in patients with acute Kawasaki disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1257–64.
18. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour–mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1369–75.

19. Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, et al. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med* 2008; 34:1371–6.

Ejemplo 4

Tiras de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de diagnóstico–diseño 1

5 Los niveles de proteínas biomarcadoras descritos en este documento se pueden determinar utilizando tiras de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) como se ilustra en la Fig. 11–12. Esta tira de ensayo se puede utilizar en pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POCT). La tira de ensayo tiene una posición de la muestra (S) en un extremo de tira de ensayo y una posición de control (C) se encuentra en el extremo opuesto de la tira de ensayo (Fig. 11A). Hay una posición de ensayo (T) situada en el centro de la tira de ensayo, entre S y T. Para esta realización de una tira de ensayo, el soporte sólido 101 puede estar hecho de plástico u otro material no poroso, apoyando la matriz 103. Situado en S es una cantidad definida de anticuerpo proteína anti–biomarcadora deshidratado. La cantidad definida de anticuerpo proteína anti–biomarcadora deshidratado, cuando se rehidrata, se unirá a la saturación de una cantidad fija de antígeno biomarcadora, lo que significa que esta cantidad fija de proteína biomarcadora ocupará completamente todos los sitios de unión Fv de la cantidad definida de anticuerpos. Si hay proteína biomarcadora adicional en exceso de la cantidad fija de biomarcador que se requiere para unir a todos los de la cantidad de anticuerpo de la posición S, el exceso de proteínas biomarcadoras serán libres y no están vinculados a ningún anticuerpo en la forma de un complejo anticuerpo–biomarcador. La cantidad fija de proteína biomarcadora es el nivel de referencia predeterminado de la proteína biomarcadora que es el nivel encontrado en individuos sanos que no tienen apendicitis aguda. El anticuerpo en la posición S se puede conjugar a perlas de oro coloidales o perlas de látex coloreadas para fines de visualización. En la posición T, hay una cantidad definida de proteína biomarcadora inmovilizada en la tira de ensayo. Esta es la misma proteína biomarcadora que une el anticuerpo depositado en la posición S. En la posición C, hay otra proteína inmovilizada, un anticuerpo inmunorreactivo con el anticuerpo proteína anti– biomarcadora situado en la posición S (Fig. 11).

25 La siguiente es una descripción sobre cómo usar e interpretar los resultados obtenidos para la tira de ensayo se muestra en la Fig. 11. Una muestra de orina se aplica en S. El agua en la orina rehidrata el anticuerpo proteína anti–biomarcadora deshidratado que se ha depositado en S. El anticuerpo proteína anti–biomarcadora deshidratado se puede marcar con perlas de oro coloidal o perlas de látex coloreadas. La proteína biomarcadora en la orina se une a este anticuerpo proteína anti–biomarcadora rehidratado para formar un complejo anticuerpo–biomarcador. Cualquier proteína biomarcadora en la orina que está en exceso del anticuerpo proteína anti–biomarcadora rehidratado depositado en S será libre y no está unido a cualquier anticuerpo. Una mezcla de complejo anticuerpo–biomarcador y anticuerpo libre o biomarcador libre se moverá por la acción capilar lejos de la posición S y se moverá hacia la posición T y, posteriormente, a la posición C. Cuando la proteína biomarcadora de interés está por debajo del nivel de referencia, la mezcla de anticuerpo y la proteína biomarcadora contendrá anticuerpo proteína anti–biomarcadora libre y los complejos de proteína biomarcadora–anticuerpo. En la posición T, cualquier anticuerpo proteína anti–biomarcadora libre se unirá a la proteína biomarcadora inmovilizada en T. La concentración localizada de anticuerpo proteína anti–biomarcadora libre que es perla de oro coloidal o látex marcado se hará visible como una línea de color en la posición T (Fig. 12B). Hay anticuerpo libre sólo cuando la proteína biomarcadora en la orina está por debajo del valor de referencia umbral encontrado en seres humanos sanos, que es el nivel de referencia predeterminado de la proteína biomarcadora. Cuando la proteína de interés está en o por encima del nivel de referencia predeterminado, la mezcla de anticuerpo y proteína biomarcadora contendrá todos los complejos de anticuerpo y proteínas biomarcadoras y anticuerpo no libre de proteínas antibiomarcadoras. En la posición T, no habrá ningún anticuerpo proteína anti–biomarcadoras capturado por la proteína biomarcadora inmovilizado. Por lo tanto, no habrá acumulación perlas de oro coloidal o látex marcada con anticuerpo anti–proteína, y el área queda claro (Fig. 12A). En la posición C, el complejo anticuerpo–biomarcador formado inicialmente en S será unido y capturado por el anticuerpo inmovilizado inmunorreactivo contra el anticuerpo anti–proteína precedente de la posición S. Esto a su vez dará lugar a una concentración de anticuerpo anti–proteína marcado con perla de oro coloidal o látex acumulado en la posición C y llegará a ser visible como una línea de color en la posición C. El resultado de la posición C sirve como control de ensayo para indicar que es un anticuerpo anti–proteína funcional en el material de ensayo y siempre debe estar presente (Fig. 12A y 12B). Cuando una cantidad suficiente de anticuerpo proteína anti–biomarcadora marcado del complejo se acumula en C, una banda se hace visible aquí. Una banda en C indica que el anticuerpo marcado de S se había trasladado a C. Por lo tanto, una banda a C indica que la banda en T no es un falso positivo. Las puntas de flecha indican el límite marginal que una muestra de orina no debe cruzar en la tira de ensayo.

55 Las figs. 12A–12D muestran los posibles resultados e interpretaciones de los resultados de dicha tira de ensayo. La fig. 12A muestra ninguna banda en la posición T, pero una banda distinta en la posición C, lo que indica que el nivel de proteína biomarcadora es nivel de referencia predeterminado superior. La apendicitis aguda se indica. La fig. 12B muestra una banda en la posición T y una banda distinta en la posición C, lo que indica que el nivel de proteína biomarcadora está por debajo de nivel predeterminado de referencia. La apendicitis aguda no está indicada. La fig. 12C muestra una banda en la posición T, pero ninguna banda en la posición C, lo que indica que los datos en T puede ser un

falso positivo. La fig. 12D muestra ninguna banda en cualquiera de las posiciones de T y C, indicando que los datos de T pueden ser un falso negativo. Ambas Figs. 12C y 12D indican datos no válidos y el inmunoensayo de flujo lateral se deben repetir con una nueva tira de ensayo.

5 La cantidad definida de anticuerpo anti-proteína deshidratado en la posición S es tal que hay suficiente anticuerpo para unir la proteína biomarcadora de la muestra (por ejemplo, orina) cuando la proteína biomarcadora está en el nivel de referencia/control. El nivel de referencia/control puede ser el nivel de los biomarcadores encontrados en las muestras de individuos sanos. Por lo tanto, cuando la proteína biomarcadora está en o por encima del nivel de referencia, todos los anticuerpos antibiomarcador en la posición S se unirá a la proteína biomarcadora en forma de complejo de anticuerpo-proteína biomarcadora; no habrá anti-anticuerpo libre de proteínas biomarcadoras presente.

10 La elección del anticuerpo proteína anti-biomarcadora colocada en la posición S puede ser cualquier anticuerpo que es específicamente inmunorreactivo con cualquiera de las proteínas de interés, por ejemplo, biomarcadora descrita en este documento. El anticuerpo puede ser anticuerpo monoclonal, policlonal, o una mezcla de ambos anticuerpos monoclonales y policlonales. También se puede utilizar una unidad estructural basada en anticuerpos.

15 Cuando se estudia sólo una proteína biomarcadora, la posición S debe tener solamente un anticuerpo proteína anti-biomarcadora que específicamente inmunorreactivo con sólo ese biomarcador de interés (Fig. 13). Un kit que comprende tiras de ensayo para su uso como POCT puede tener diversas tiras de ensayo de proteína biomarcadora sola. El kit puede probar para un solo biomarcador o más, entonces una proteína biomarcadora. La tira de ensayo se puede marcar 131 en un extremo para identificar la proteína biomarcadora de la tira de ensayo se utiliza para, por ejemplo, el marcador de "L" representa leucina α -2 glucoproteína (LRG) (de acuerdo con la invención); "M" representa lectina serina proteasa de unión a manano 2 (MASP2) (no de acuerdo con la invención); y "O" representa α -1-glucoproteína ácida 1 (ORM) (no de acuerdo con la invención) (véase la Fig. 13). Por otro lado, si más de uno, por ejemplo, tres proteínas biomarcadoras deben ser estudiadas de forma simultánea, la posición S puede tener tres tipos diferentes de anticuerpos proteína anti-biomarcadora, cada tipo específicamente inmunorreactivo con una proteína biomarcadora y no presenta reactividad cruzada con las otras dos proteínas no unidas (Fig. 14). Las puntas de flecha indican el límite marginal que la muestra no debe cruzar en la membrana. En las posiciones T o C, hasta tres bandas pueden ser visibles, cada banda correspondiente a cada uno de la proteína biomarcadora que se está probando. Cuando tres proteínas deben ser estudiadas de forma simultánea, los tres tipos de proteínas pueden ser representadas en la posición T y en sus respectivas cantidades (Fig. 14). La figura 14 muestra un diseño alternativo donde tres proteínas se pueden estudiar simultáneamente en la misma tira de ensayo. Las posiciones de los resultados esperados en las posiciones T y C para cada biomarcador se indican 141.

25 La tira de ensayo puede ser diseñada en una forma de una tira de ensayo con varilla indicadora (Fig. 11B). Como una tira de ensayo con varilla indicadora, la tira se sumerge en una muestra (por ejemplo, orina) en la posición S final con el nivel de la muestra no exceda el límite marginal. La tira entonces se coloca horizontalmente con la superficie de la membrana hacia arriba en una superficie plana. Una cantidad fija de tiempo se da para la rehidratación de anticuerpos, acción capilar, y reacción de unión de proteína biomarcadora de anticuerpos que tenga lugar. Al final del tiempo fijo, no debe haber bandas visibles en la posición C y en función del nivel de la proteína de interés, puede o no ser una banda visible en la posición T (Fig. 12). La figura 13 muestra un método de uso de tres tiras de ensayo con varilla indicadora separadas para la prueba de los tres biomarcadores de interés. Cada tira de ensayo con varilla indicadora se marca 131 para indicar qué proteína biomarcadora se está probando. Un kit de diagnóstico puede comprender múltiples tipos de tiras de ensayo de biomarcadores individuales, un tipo para cada biomarcador de interés.

Ejemplo 5

Tiras de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de diagnóstico-diseño 2

45 Una realización alternativa de las tiras de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) para determinar el nivel del nivel de proteína biomarcadora se ilustra en la Fig. 15A-D. Esta tira de ensayo se puede utilizar en pruebas de diagnóstico en el punto de atención. En este documento la tira de ensayo contiene dos anticuerpos proteína anti-biomarcadora específicos diferentes para el mismo biomarcador, cada anticuerpo une el biomarcador a un epítipo diferente. Se trata de una tira de ensayo LFIA de doble sándwich. El primer anticuerpo está marcado (por ejemplo, Perlas de látex coloreadas), depositada sobre la matriz sólida de soporte, pero no está inmovilizado sobre el mismo, (i. e., el anticuerpo es móvil), y se deposita en exceso en la posición S. El segundo anticuerpo proteína anti-biomarcadoras no está marcado, pero se inmoviliza y se encuentra en exceso en la posición T. Este segundo anticuerpo proteína anti-biomarcadora se une a un epítipo en el biomarcador que no se ve afectado por la unión del primer anticuerpo. En la posición C, hay un exceso de anticuerpo no marcado contra el anticuerpo antibiomarcador depositado en la posición S. El anticuerpo en C sirve para capturar cualquier anticuerpo antibiomarcador marcado libre que migran de S. Cuando suficiente anticuerpo antibiomarcador marcado libre se acumula en C, aparece una banda visible. La banda es un control para confirmar que la(s) banda(s) observada(s) en la tira de ensayo en T se debe al anticuerpo móvil en la posición S.

Inicialmente antes de su uso, no hay ninguna banda visible en la posición T y C de la tira de ensayo (Fig. 15B). Cuando una muestra de fluido (por ejemplo, orina) es el lugar en la posición S, el agua en la orina rehidrata el anticuerpo proteína anti-biomarcadora deshidratado que se ha depositado en S. El anticuerpo proteína anti-biomarcadora deshidratado se puede marcar con perlas de oro coloidal o perlas de látex coloreadas. La proteína biomarcadora en la orina se une a este anticuerpo proteína anti-biomarcadora rehidratado para formar un complejo anticuerpo-biomarcador. Se forma una mezcla de anticuerpo antibiomarcador libre y complejos de anticuerpo:proteína biomarcadora. La mezcla migra por acción capilar hacia las posiciones T y C. El segundo anticuerpo antibiomarcador inmovilizado en T capturará todos los complejos proteína biomarcadora:anticuerpo, pero no el anticuerpo proteína anti-biomarcadora libre. La concentración localizada de complejos proteína anti-biomarcadora: anticuerpo que es perla de oro coloidal o látex marcada se hará visible como una línea de color en la posición T (figura 15C). Sólo cuando la proteína biomarcadora está en o por encima del nivel de referencia suficiente anticuerpo marcado será capturado en T para producir una banda visible (Fig. 15C). Cuando el biomarcador está por debajo del nivel de referencia, ninguna banda visible debe aparecer en la posición T (Fig. 15D).

En la posición C, el anticuerpo libre de antibiomarcador inicialmente a partir de S será unido y capturado por el anticuerpo inmovilizado inmunorreactivo contra el anticuerpo procedente de la posición S. Esto a su vez dará lugar a una concentración de un anticuerpo anti-proteína marcado con perla de oro coloidal o látex acumulado en la posición C y llegará a ser visible como una línea de color en la posición C. El resultado de la posición C sirve como control de ensayo para indicar que no es un anticuerpo anti-proteína funcional en el material de ensayo y siempre debe estar presente. Una banda en C indica que el anticuerpo marcado de S se ha movido a C. Por lo tanto, una banda en C indica que la banda en T no es un falso positivo o que la ausencia de una banda en T es un falso negativo.

Ejemplo 6

Tiras de ensayo de inmunoensayo de flujo lateral de diagnóstico-diseño 3

Una realización alternativa de las tiras ensayo de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA) para determinar el nivel de nivel de proteína biomarcadora se ilustra en la Fig. 16. Esta tira de ensayo se puede utilizar en las pruebas de diagnóstico en el punto de atención. La tira de ensayo es como se describe en la Fig. 11 que tiene posiciones de una muestra (S), una prueba (T), y un control (C), los tres dispuestos espacialmente como se muestra en la fig. 11 y la fig. 15. Para esta realización de una tira de ensayo, el soporte sólido 161 puede estar hecho de plástico u otro material no poroso, soportando la matriz 163. En esta realización, la posición S contiene una cantidad en exceso de anticuerpo proteína antibiomarcador deshidratado (primer anticuerpo) que pueden ser marcados (por ejemplo, oro coloidal o perla de látex de color). Similar a las realizaciones de las Fig. 11-14, el anticuerpo proteína anti-biomarcadora en S es móvil; una vez que el anticuerpo se re-hidrata, el anticuerpo se mueve por la acción capilar hacia las posiciones T y C.

La posición T contiene un segundo anticuerpo proteína anti-biomarcadora que también es inmunorreactivo con la proteína biomarcadora de interés, pero a un epítipo diferente en el biomarcador (Fig. 16). Este segundo anticuerpo es en exceso y se inmoviliza en la matriz. Este segundo anticuerpo proteína anti-biomarcadora se une a una parte de la proteína biomarcadora que es diferente de la parte de la proteína que se une el primer anticuerpo proteína anti-biomarcadora que se encuentra en la posición S. En esta realización, el segundo anticuerpo en la posición T se unirá y capturará ambos complejos de proteína biomarcadora no unida libre y anticuerpo proteína biomarcadora, y concentrarlos en la posición T.

La posición C contiene una cantidad definida de proteína biomarcadora inmovilizada en la membrana (Fig. 16B). La cantidad definida es el valor de referencia predeterminado de la proteína biomarcadora que se está analizando en la tira de ensayo. El nivel de referencia/control puede ser el nivel del biomarcador encontrado en las muestras de hombres sanos. Cuando el exceso de anticuerpo proteína anti-biomarcadora libre de la posición S llega y une la proteína biomarcadora inmovilizada en C, la acumulación gradual en C produce una concentración de anticuerpo primera marcado se hará visible como una línea de color en la posición C (Fig. 17A, B, D).

Una aplicación de una muestra de fluido (por ejemplo, orina) en la posición S se rehidratará la cantidad en exceso de anticuerpo proteína anti-biomarcadora allí. La totalidad de la proteína biomarcadora de interés debe estar unida al exceso de anticuerpo proteína anti-biomarcadora. Se forma una mezcla de fluido de anticuerpo proteína biomarcadora libre y complejo de proteína biomarcadora-anticuerpo y se moverá a lo largo de la membrana por acción capilar hacia la posición T y, posteriormente, a la posición C. En la posición T, todo el complejo de proteína biomarcadora-anticuerpo será capturado e inmovilizado por el segundo anticuerpo proteína anti-biomarcadora. La concentración localizada de complejos de proteína biomarcadora-anticuerpo, en donde el anticuerpo proteína anti-biomarcadora que es perla de oro coloidal o látex marcada, llegará a ser visible como una línea de color en la posición T (Fig. 17A, B, D). Con una cantidad creciente de complejos de proteínas biomarcadora-anticuerpo y se concentró en la posición T, la línea de color se expande y se convierte en una banda. Cuanto mayor es el nivel de biomarcador en la muestra, mayor será la banda de color en la posición T (Fig. 17A y B).

5 Cuando el exceso de anticuerpo proteína anti-biomarcadora libre desde la posición S llega a la posición C y se une a la
cantidad de referencia inmovilizada de la proteína biomarcadora allí, otra línea de color se hace visible. Puesto que
10 existe una cantidad de referencia de la proteína biomarcadora inmovilizada en la posición C, el espesor de la línea de
color visible en la posición C define el valor de referencia de la proteína. Al comparar el espesor de la banda de color en
15 las posiciones T y C en la misma tira de ensayo, se puede estimar si el nivel de proteína biomarcadora es inferior a o
mayor que el valor de referencia de la proteína. Cuando el nivel de proteína biomarcadora es igual o mayor que el valor
de referencia, la banda de color en la posición T será igual o mayor que la banda de color en la posición C,
respectivamente (Fig. 17A y B). La apendicitis aguda se indica. Cuando el nivel de proteína biomarcadora está por
debajo del nivel de umbral, la banda de color en la posición T será más pequeño o incluso ausente de la banda de color
20 en la posición C (Fig. 17C y D). La apendicitis aguda no está indicada. La banda de posición C también sirve como un
control de ensayo para confirmar que no es un anticuerpo anti-proteína funcional en la posición S y que el anticuerpo
proteína anti-biomarcadora funcional se deriva de la posición S (Fig. 17E y F). La fig. 17E muestra una banda en la
posición T, pero ninguna banda en la posición C, lo que indica que los datos en T puede ser un falso positivo. La fig. 17F
25 muestra ninguna banda en cualquiera de las posiciones de T y C, indicando que los datos de T pueden ser un falso
negativo. Ambas Figs. 17E y 17F indican datos no válidos y que el inmunoensayo de flujo lateral se deben repetir con
una nueva tira de ensayo.

30 Cuando se estudia sólo una proteína biomarcadora, la posición S debe tener solamente un anticuerpo proteína anti-
biomarcadora que específicamente inmunorreactivo con sólo ese biomarcador de interés. Un kit que comprende tiras de
ensayo para su uso como POCT puede tener diversas tiras de ensayo de biomarcadores de proteína sola. El kit puede
probar para un solo biomarcador o más de una proteína biomarcadora. La tira de ensayo se puede marcar 181 en un
extremo para identificar la proteína biomarcadora la tira de ensayo se utiliza para, por ejemplo el marcador de "L"
representa leucina α -2 glucoproteína (LRG) (de acuerdo con la invención); "M" representa lectina serina proteasa de
unión a manano 2 (MASP2) (no de acuerdo con la invención); "O" representa α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM) (no de
25 acuerdo con la invención) y "S" representa α -1-antiquimotripsina (SERPINA3) (no de acuerdo con la invención) (véase
la Fig. 18). Por otro lado, si más de uno, por ejemplo, tres proteínas biomarcadoras deben ser estudiadas de forma
simultánea, la posición S puede tener tres tipos diferentes de anticuerpos proteína anti-biomarcadora, cada tipo
específicamente inmunorreactivo con una proteína biomarcadora y no presenta reactividad cruzada con las otras dos
proteínas no unidas (Fig. 19). La figura 19 muestra una realización alternativa de una tira de ensayo donde tres
30 proteínas biomarcadoras se pueden estudiar simultáneamente en la misma tira de ensayo. Las posiciones para cada
biomarcador en la única tira se indican 191.

La tira de ensayo puede ser diseñada en una forma de una tira de ensayo con varilla indicadora (Fig. 16B). Como una
tira de ensayo con varilla indicadora, la tira se sumerge en una muestra (por ejemplo, orina) en la posición S final con el
nivel de la muestra no excede el límite marginal. La tira entonces se coloca horizontalmente con la superficie de la
35 membrana hacia arriba en una superficie plana. Una cantidad fija de tiempo se da para la rehidratación de anticuerpos,
acción capilar, y tenga lugar la reacción de unión de anticuerpo proteína biomarcadora. Al final de tiempo fijo, debe
haber bandas visibles en la posición C y en función de los niveles de la(s) proteína(s) biomarcadora(s) de interés, puede
o no ser una banda visible en la posición T (Fig. 18 y 19) y las bandas pueden ser de cualquier espesor diferente. La
fig.18 muestra un método de utilización de cuatro tiras de ensayo con varilla indicadora separados para la prueba de los
40 cuatro biomarcadores de interés. Tal tira de ensayo puede ser el componente de un kit de diagnóstico. Cada tira de
ensayo con varilla indicadora está marcada 181 para indicar qué proteína biomarcadora se está probando. Un kit de
diagnóstico puede comprender múltiples tipos de tiras de ensayo de biomarcadoras individuales, un tipo para cada
biomarcador de interés.

Reivindicaciones

1. El uso de un dispositivo que comprende:
 - a. un agente de unión de proteína que se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis que comprende α -2 glucoproteína rica en leucina (LRG); y
 - 5 b. al menos un soporte sólido para el agente de unión de proteína en (a), en donde el agente de unión de proteína se deposita sobre el soporte sólido;

para identificar un sujeto que tiene apendicitis aguda, en donde si el biomarcador de apendicitis que comprende α -2 glucoproteína rica en leucina (LRG) se une específicamente al agente de unión de proteína, es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el agente de unión de proteína depositado sobre el soporte sólido se une específicamente al polipéptido biomarcador de apendicitis α -2 glucoproteína rica en leucina (LRG) de la SEQ ID NO: 1.
3. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína diferente adicional depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo que consiste en:
 - 15 S100-A8 (calgranulina); ácido α -1-glucoproteína 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa 2 de unión a manano (MASP2); zinc- α -2-glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).
4. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína diferente adicional depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionado del grupo que consiste en:
 - 20 molécula de adhesión específica a adipocito; AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor de la inter- α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción PDZK 1; PRIC285; prostaglandina-H2 D-isomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VAOD1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1-glucoproteína ácida 2; y β -1,3-galactosiltransferasa.
 - 25
5. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el soporte sólido está en el formato de una varilla indicadora, un chip microfluídico o un cartucho.
6. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el agente de unión de proteína es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, molécula pequeña o variante de los mismos.
 - 30
7. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde un nivel medido de proteína biomarcadora de apendicitis, por encima de un nivel de referencia para que la proteína biomarcadora, indica que es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda.
8. El uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el dispositivo se utiliza con una muestra de orina para el diagnóstico de apendicitis aguda.
 - 35
9. Un método para identificar la probabilidad de que un sujeto humano tenga apendicitis aguda comprende:
 - a) medir el nivel de una primera proteína biomarcadora de apendicitis que comprende leucina α -2-glucoproteína (LRG) en una muestra de orina del sujeto humano;
 - b) comparar el nivel de la primera proteína biomarcadora de apendicitis medida en la etapa (a) a un nivel de referencia para el biomarcador medido;
 - 40

en donde un nivel de biomarcador medido por encima del nivel de referencia para el biomarcador, indica que es probable que el sujeto tenga apendicitis aguda.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además determinar el nivel de albúmina en la muestra de orina del sujeto humano.
- 45 11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además medir el nivel de al menos una segunda proteína biomarcadora de apendicitis, en donde la segunda proteína biomarcadora se selecciona de un grupo

- que consiste en: molécula de adhesión específica de adipocito; calgranulina A (S100-A8); α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); zinc- α -2- glucoproteína (AZGP1); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3); apolipoproteína D (ApoD); AMBP; proteína similar a amiloide 2; enzima convertidora de angiotensina 2; BAZ1B; anhidrasa carbónica 1; CD 14; cromogranina A; FBLN7; FXR2; hemoglobina α ; hemoglobina β ; proteína antagonista del receptor de interleucina-1; inhibidor inter α -tripsina; proteína de unión de lipopolisacárido; receptor 1 del ácido hialuronano endotelial vascular linfático; MLKL; nicastrina; nueva proteína (No de acceso: IPI00550644); proteína de interacción 1 PDZK1; PRIC285; prostaglandina-H2 Disomerasa; Rcl; S100-A9; proteína A amiloide sérica; SLC13A3; SLC2A1; SLC2A2; SLC4A1; SLC9A3; SORBS 1; SPRX2; supervillin; TGFbeta2R; TTYH3; VAOD1; molécula de adhesión vascular 1; versicano; VIP36; α -1- glucoproteína ácida 2; y β -1,3- galactosiltransferasa.
- 5
- 10 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o el uso de la reivindicación 7, en donde el nivel de referencia se selecciona de: (i) un nivel del biomarcador en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda; (ii) un nivel medio del biomarcador en una pluralidad de muestras de orina de una población de seres humanos sanos que no tienen apendicitis aguda; o (iii) un nivel normalizado del biomarcador en una muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda, en donde la normalización se lleva a cabo contra el nivel de albúmina en la muestra de orina de un ser humano sano que no tiene apendicitis aguda.
- 15
- 20 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la etapa de medición a) se lleva a cabo por: un inmunoensayo, incluyendo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo, un inmunoensayo de difusión, un fluoroinmunoensayo, un inmunoensayo quimioluminiscente, un inmunoensayo de recuento, un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, y un inmunoensayo magnético; un ensayo de inmunoprecipitación; espectrometría de masas; transferencia Western; o una varilla indicadora.
- 25 14. Un dispositivo para el diagnóstico de la probabilidad de apendicitis aguda que comprende:
- a. un agente de unión de proteína que se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis comprende α -2 glucoproteína rica en leucina (LRG); y
- b. al menos un soporte sólido para el agente de unión de proteína en (a), en donde el agente de unión de proteína se deposita sobre el soporte sólido;
- 30 en donde el dispositivo comprende además al menos un agente de unión de proteína diferente adicional depositado sobre el soporte sólido, en donde el agente de unión de proteína adicional se une específicamente a una proteína biomarcadora de apendicitis seleccionada del grupo que consiste en: S100-A8 (calgranulina); α -1- glucoproteína ácida 1 (ORM); plasminógeno (PLG); lectina serina proteasa unida a manano 2 (MASP2); zinc- α -2- glucoproteína (AZGP1); apolipoproteína D (ApoD); α -1-antiquimotripsina (SERPINA3).

Figura 1

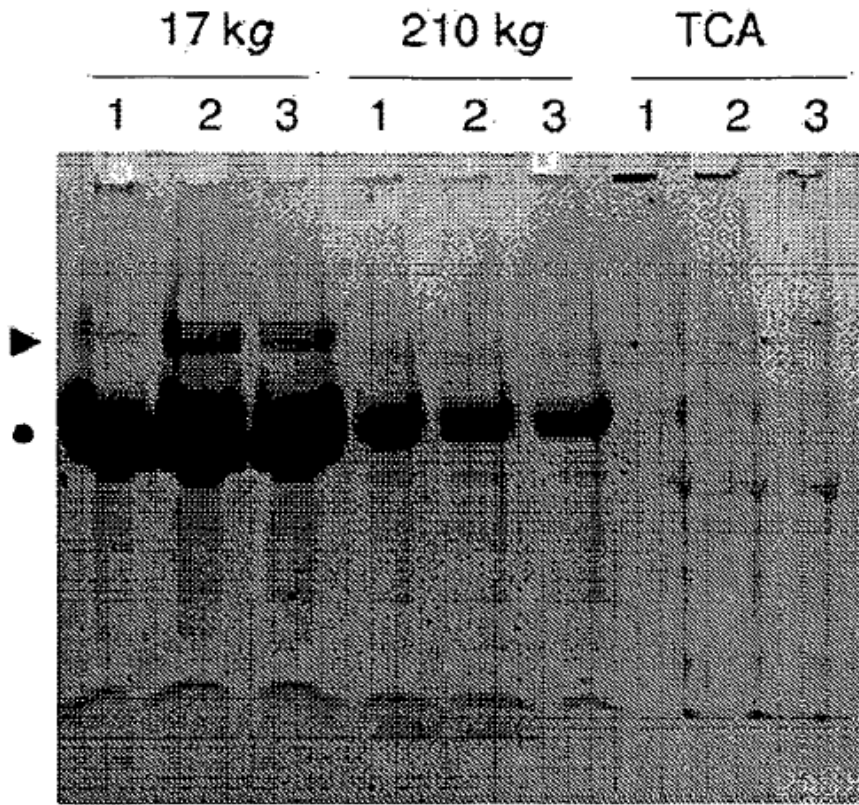


Figura 2A

Fig. 2

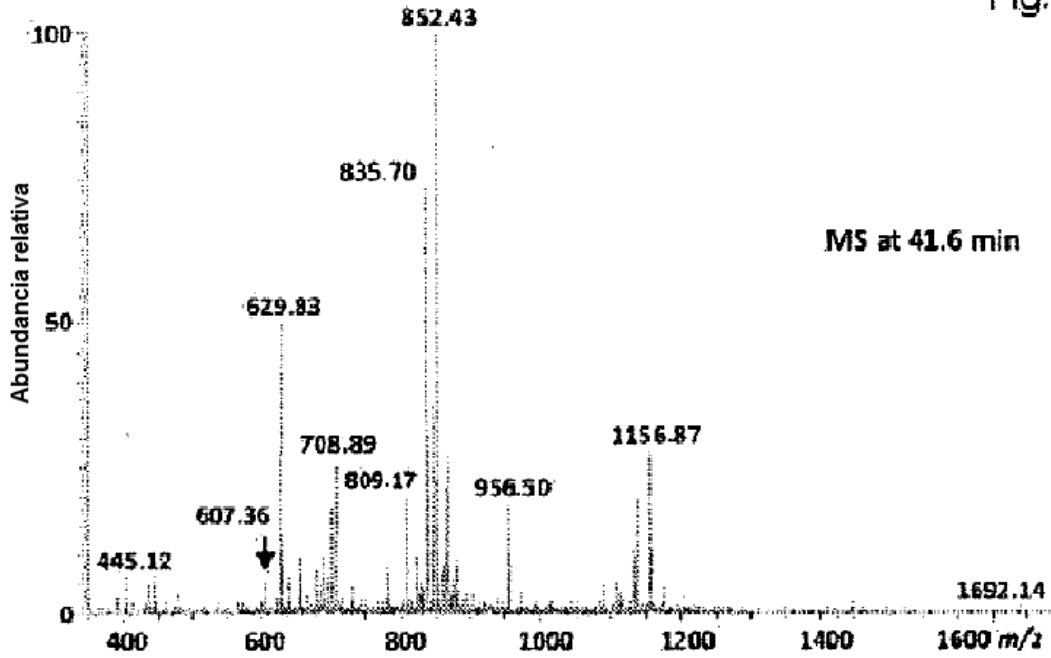


Figura 2B

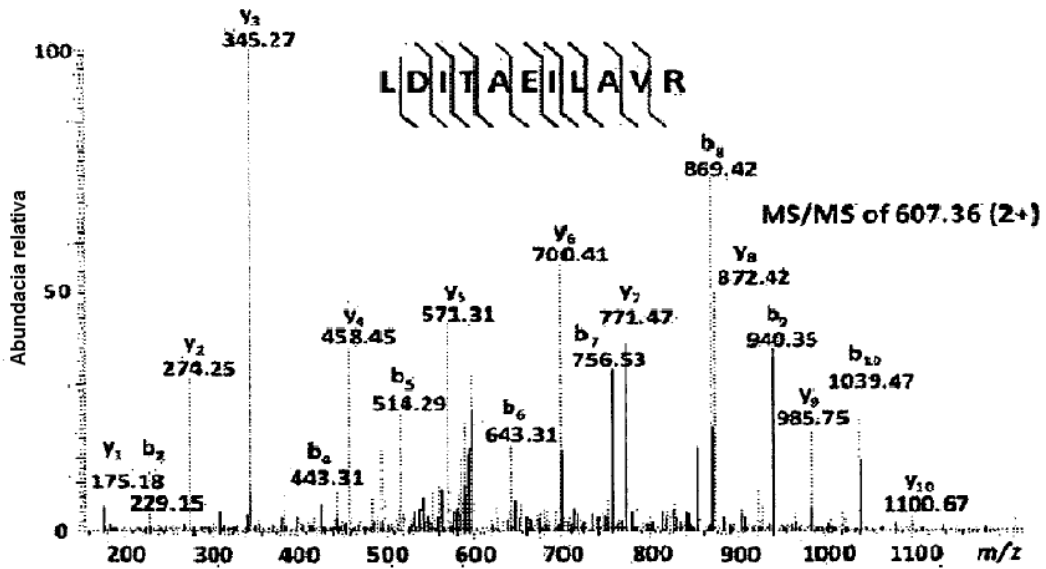
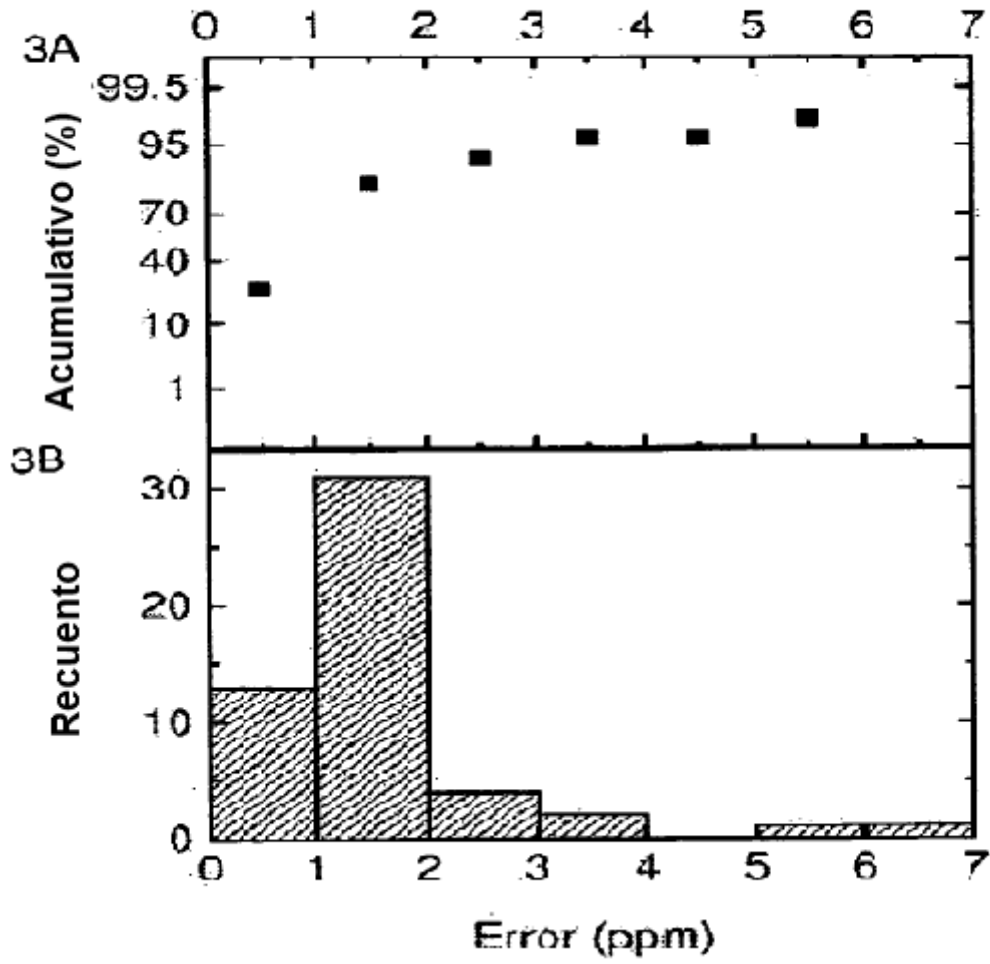


Figura 3



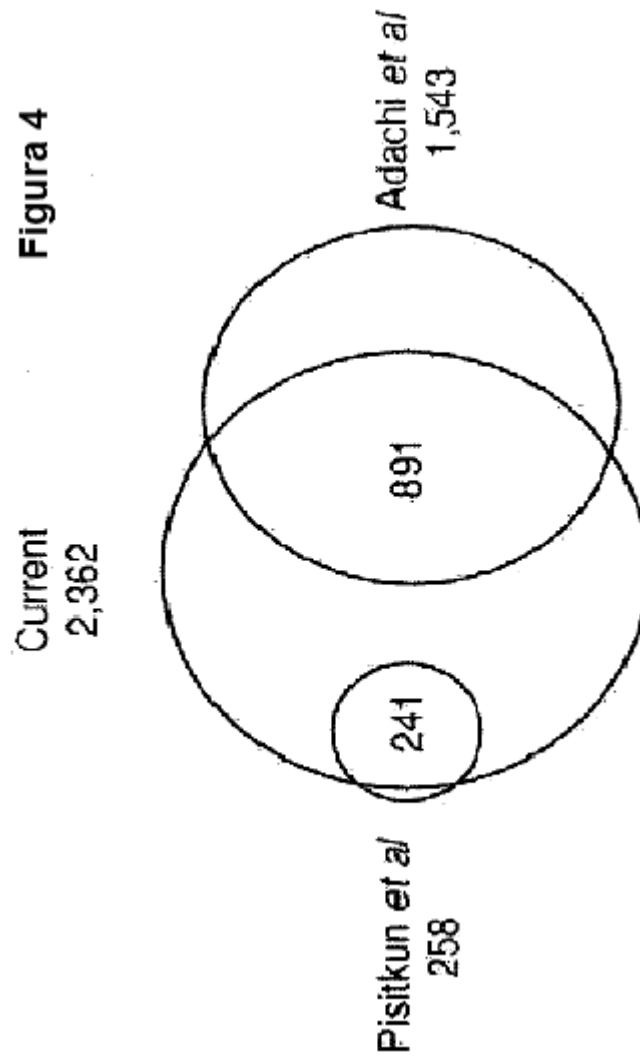


Figura 5

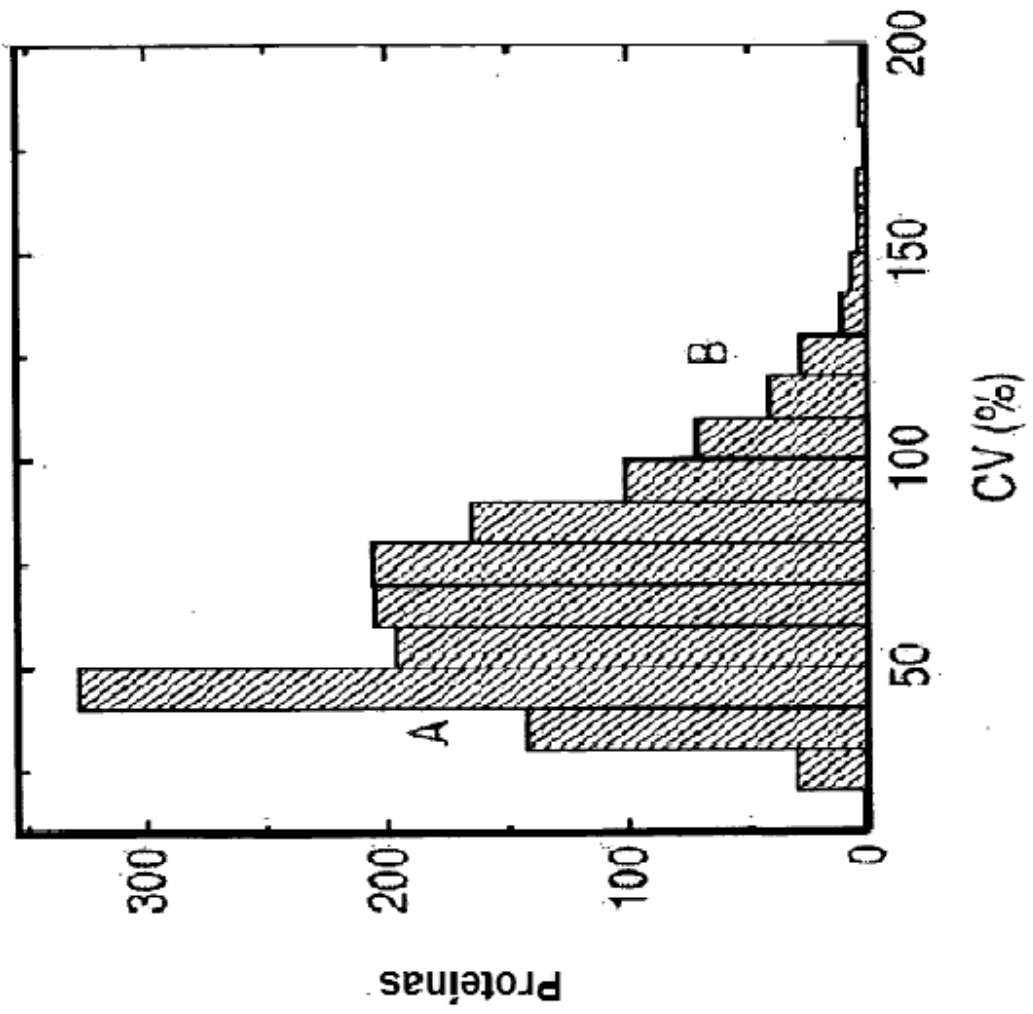


Figura 6

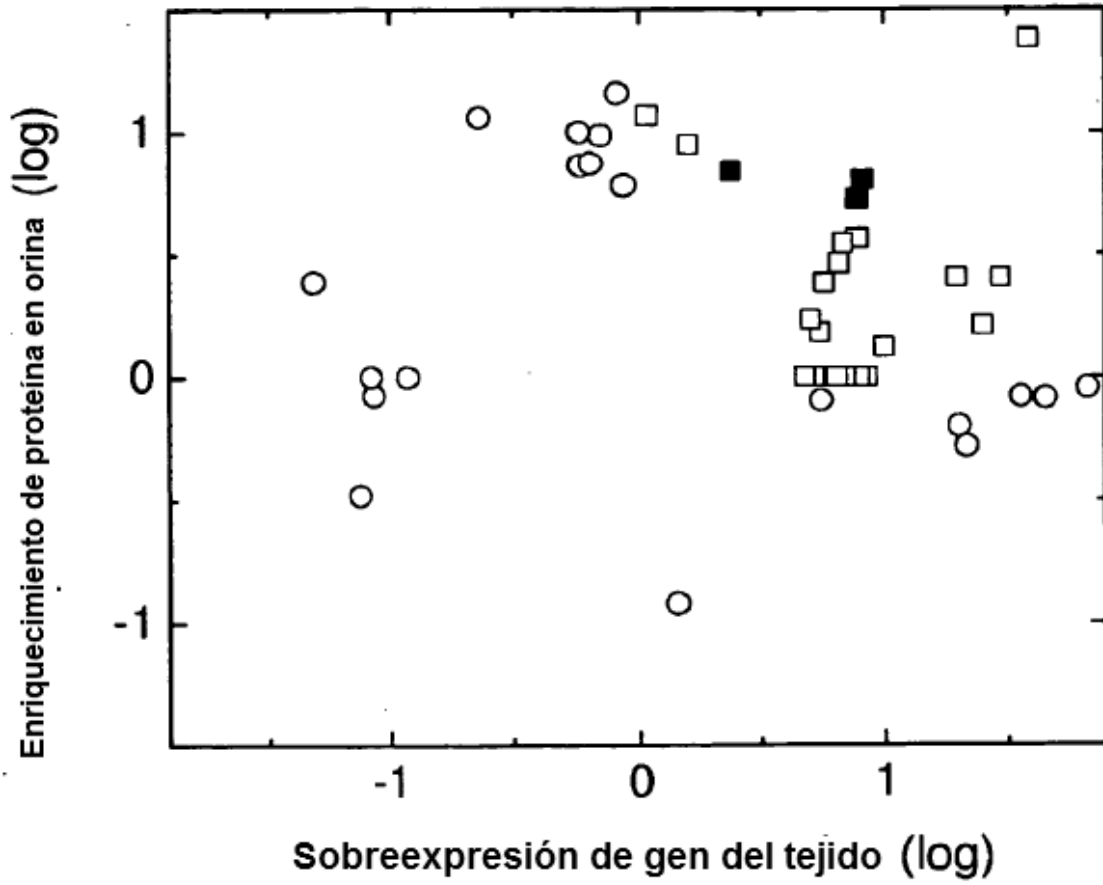


Figura 7

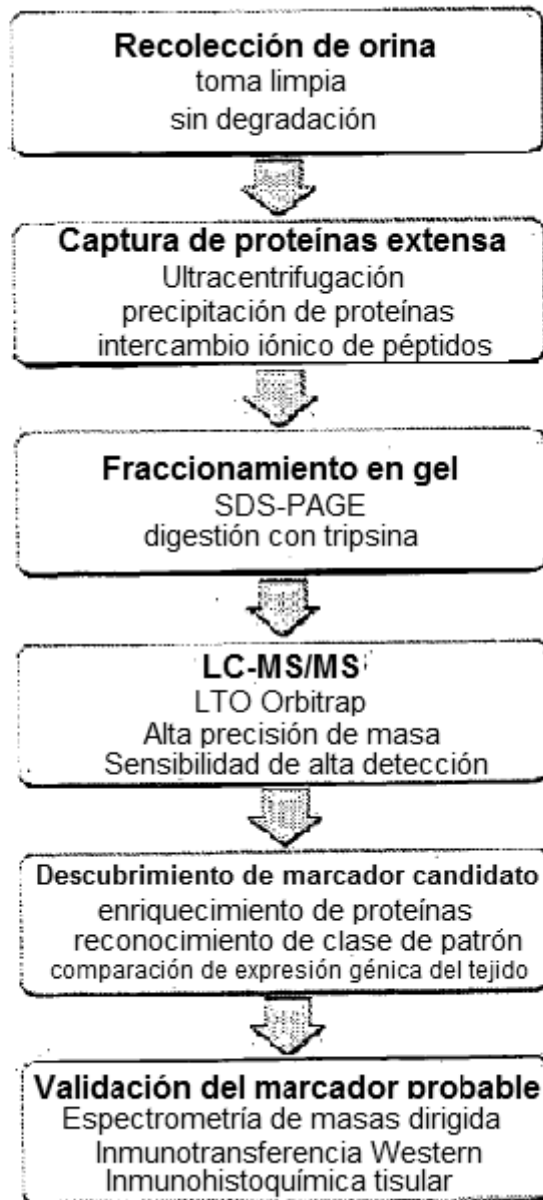


Figura 8

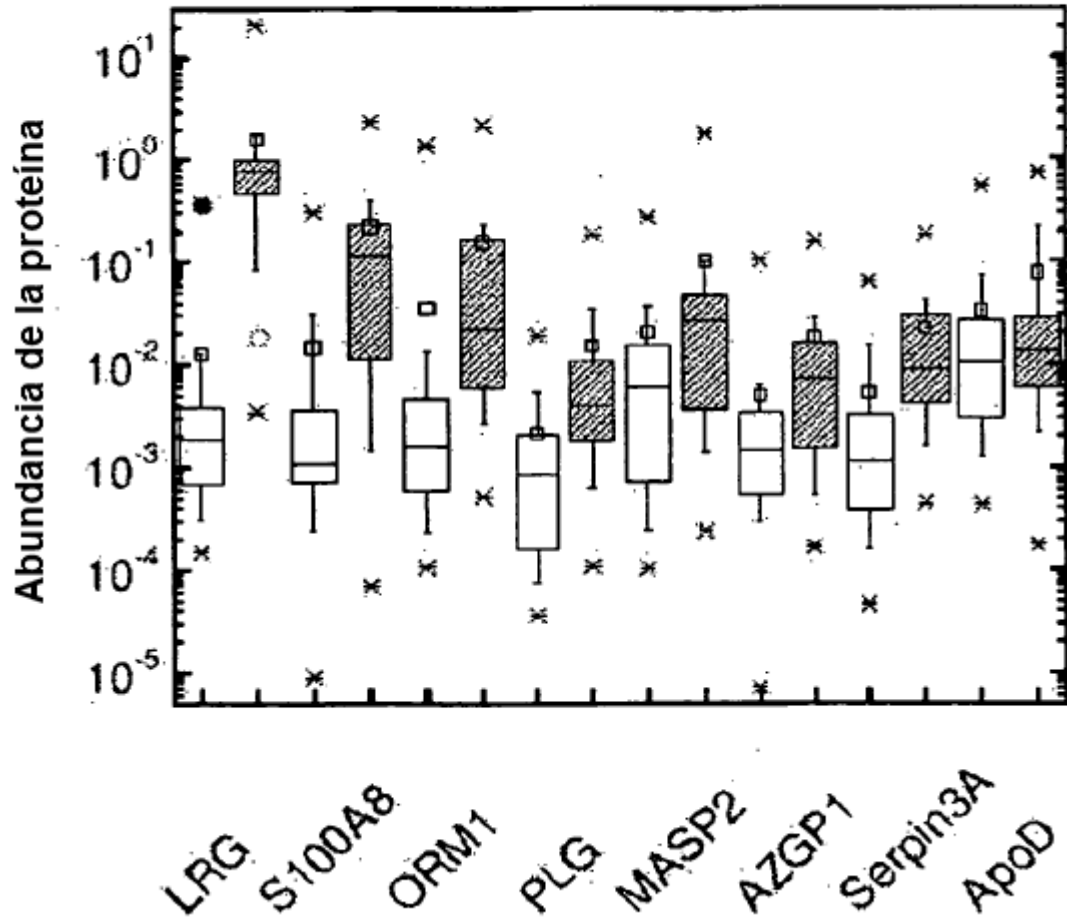


Figura 9A

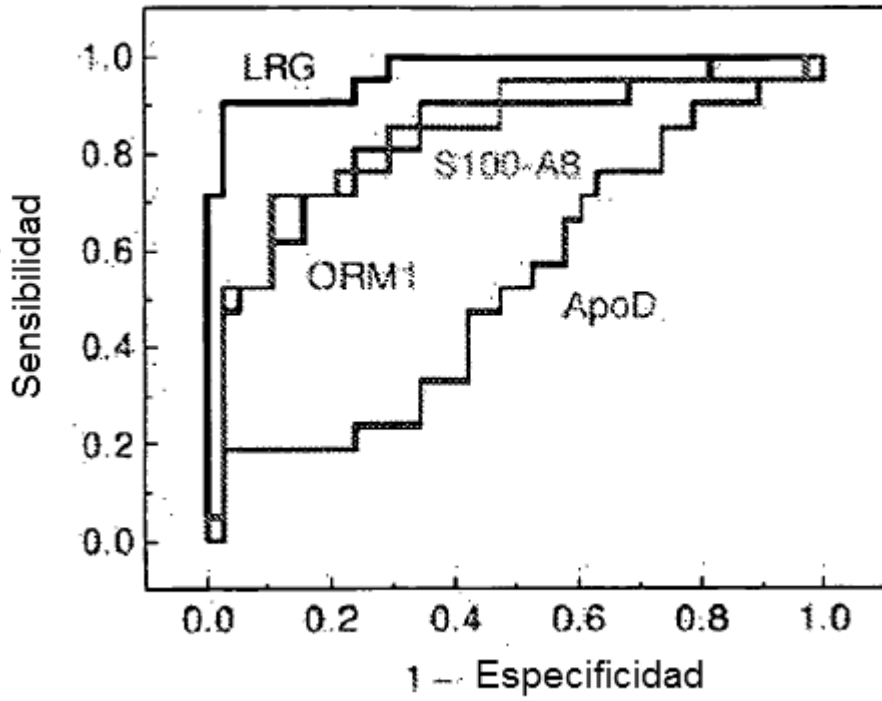


Figura 9B

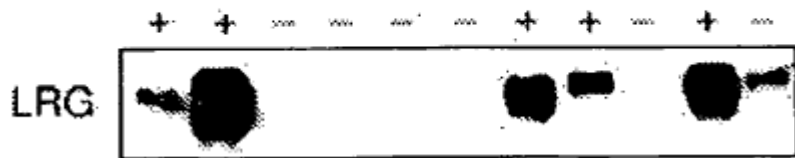


Figura 10A

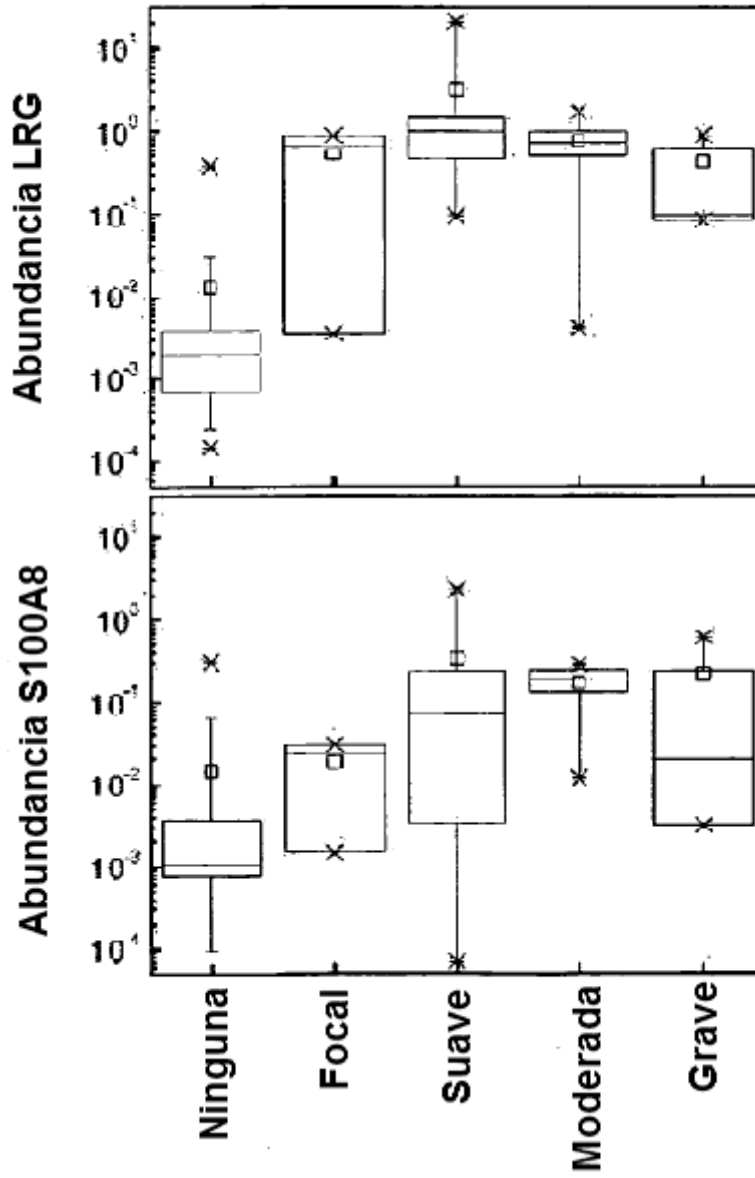


Figura 10B

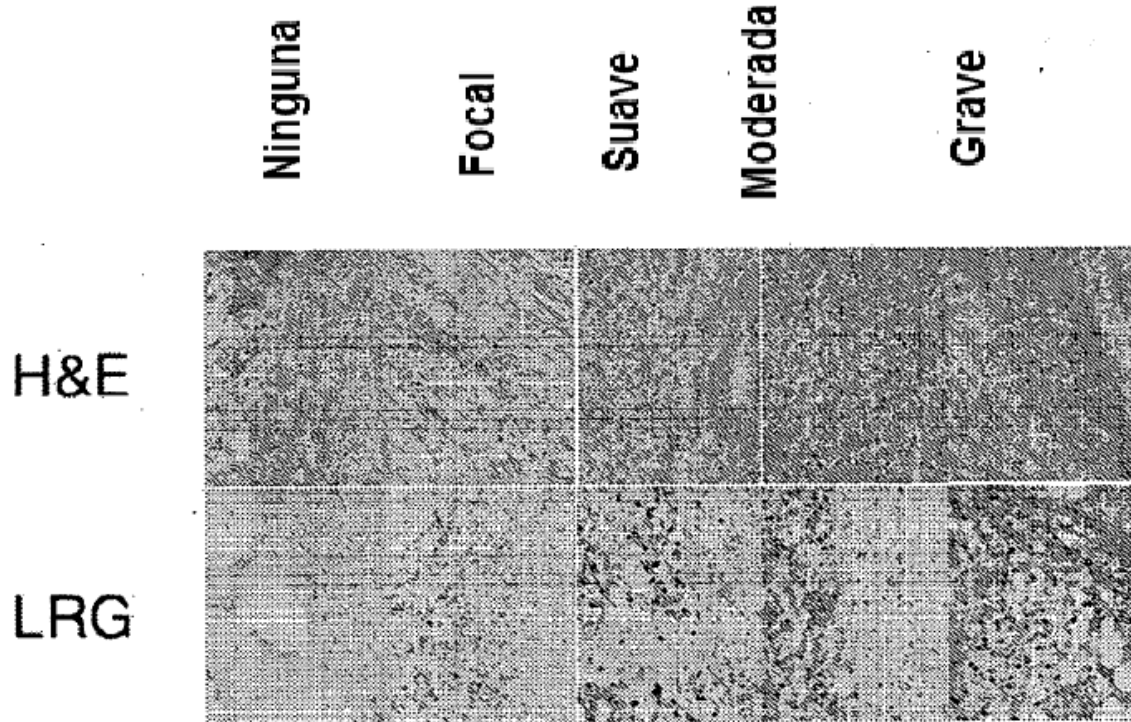


Figura 11A

(Vista superior)

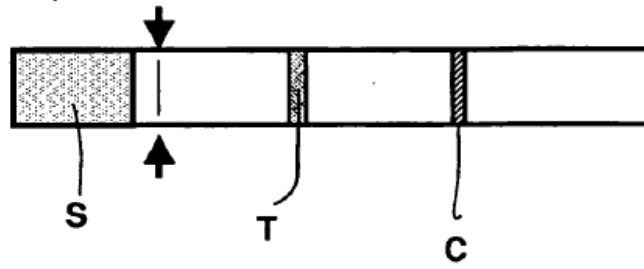


Figura 11B

(Vista de sección transversal)

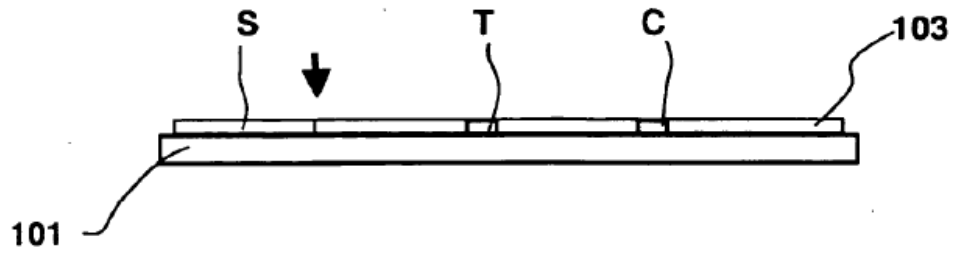


Figura 12A

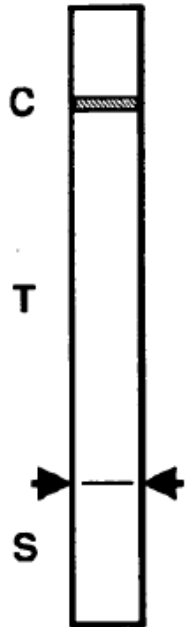


Figura 12C

Figura 12B

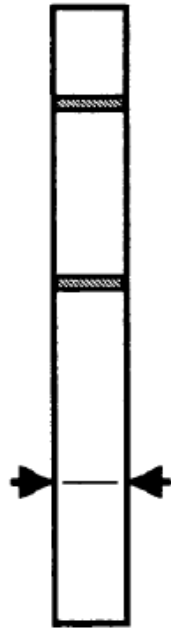


Figura 12D

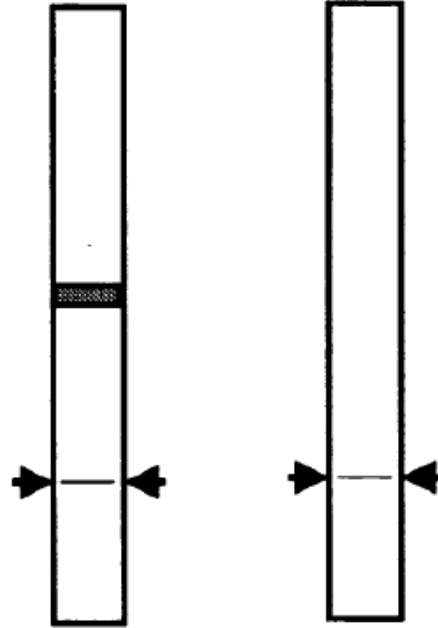


Figura 13

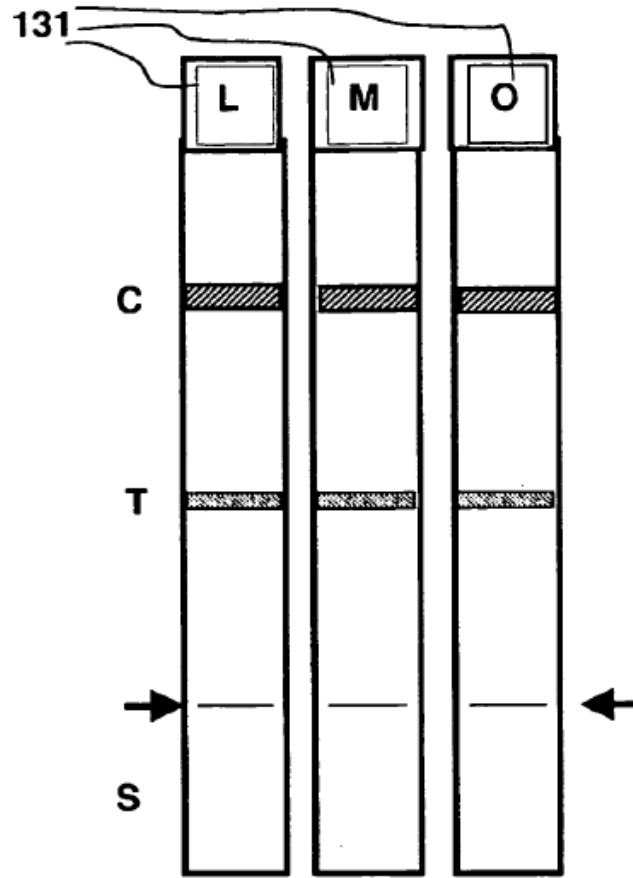


Figura 14

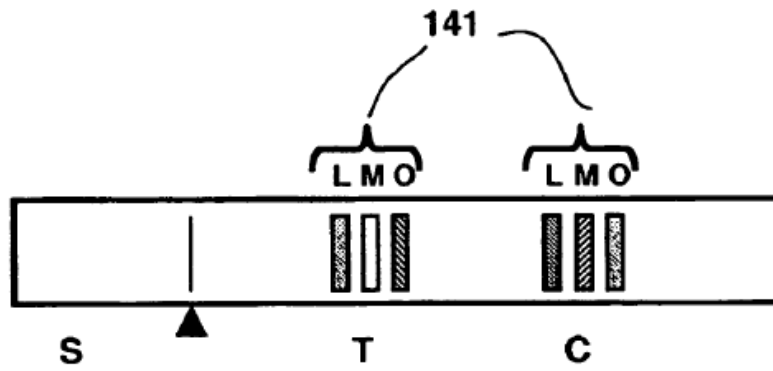


Figura 15A

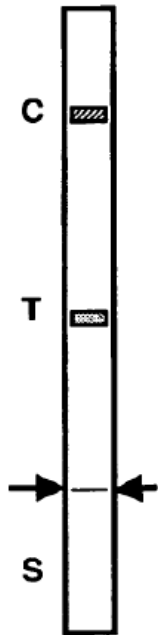


Figura 15B



Figura 15C



Figura 15D



Figura 16A
(Vista superior)

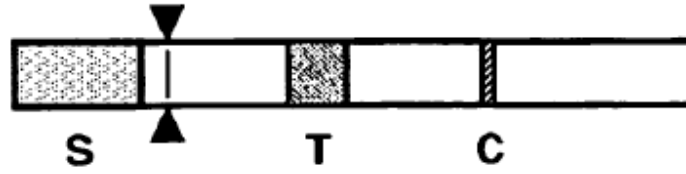


Figura 16B
(Vista de sección transversal)

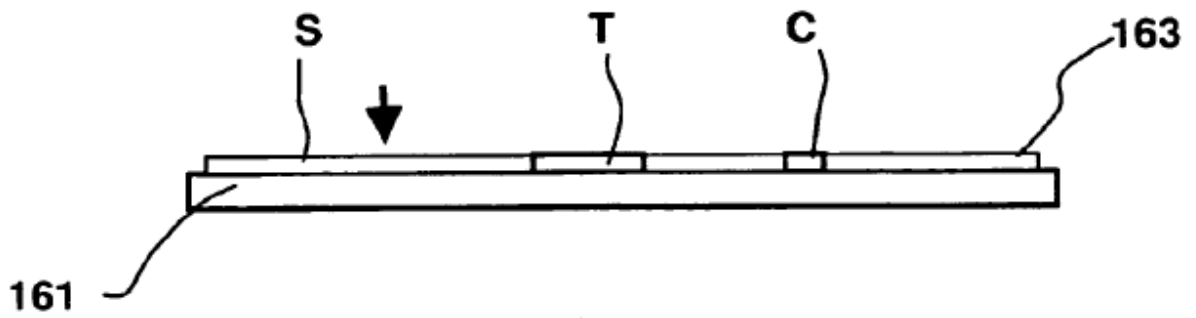


Figura 17A



Figura 17B



Figura 17C



Figura 17D

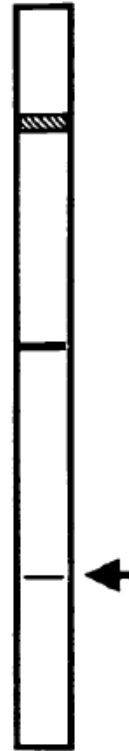


Figura 17E

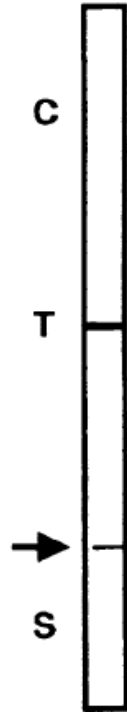


Figura 17F

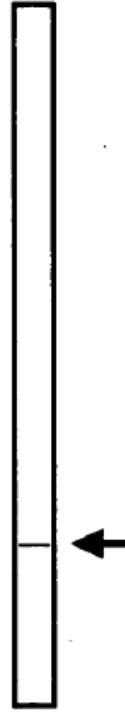


Figura 18

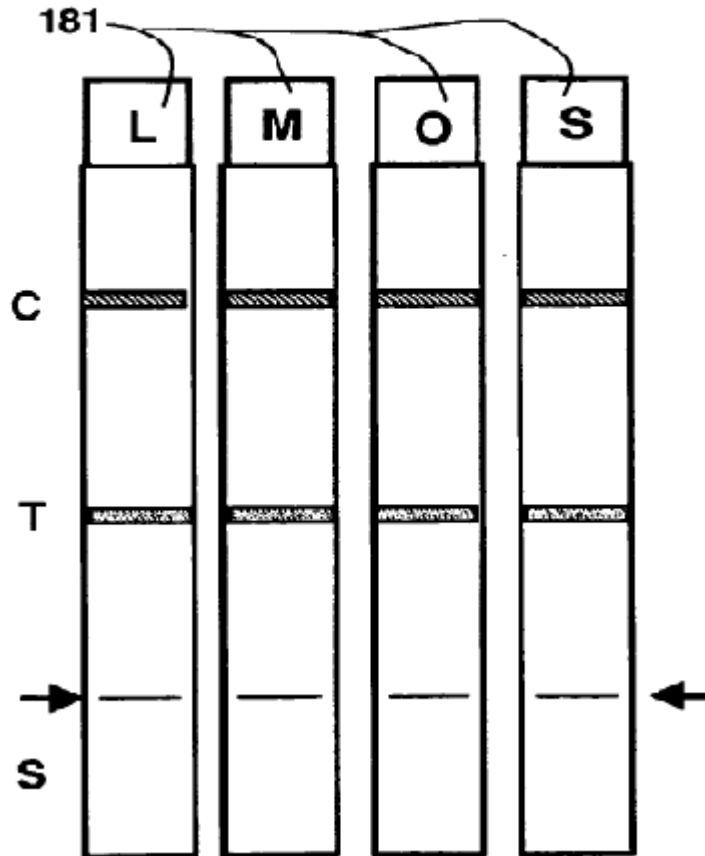


Figura 19

