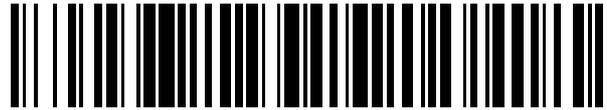


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 152**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/98 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09772535 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la • [36] a europea: **27.04.2011 EP 2313782**

54 Título: **Huella proteómica para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y/o esteatosis**

30 Prioridad:

03.07.2008 EP 08380196

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

22.01.2013

73 Titular/es:

**ONE WAY LIVER GENOMICS, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizcaya Edificio 801 A 2a
Planta
48160 Derio - Vizcaya, ES**

72 Inventor/es:

**MATO DE LA PAZ, JOSÉ MARÍA;
GALÁN COUSILLAS, ASIER;
CASTRO ESPIDO, AZUCENA y
ELORTZA BASTERRIKA, FÉLIX**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 152 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

Huella proteómica para el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y/o esteatosis

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la farmacoproteómica y, más en particular, a una firma proteómica formada por una colección de biomarcadores para la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y/o esteatosis. Dichos biomarcadores se pueden usar en métodos para diagnosticar EHNA y/o esteatosis, más específicamente para el diagnóstico temprano de EHNA y/o esteatosis, así como en métodos para determinar la predisposición de un sujeto a desarrollar EHNA y/o esteatosis, y para seguir el efecto de la terapia administrada a dicho sujeto con dichas afecciones.

Antecedentes de la invención

15 Los países occidentales representan una población de más de 200 millones de personas que padecen obesidad, por tanto considerados en riesgo de desarrollar una enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). EHGNA es un término clinicopatológico que incluye trastornos que varían desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) a la esteatosis hepática con inflamación (esteatohepatitis no alcohólica o EHNA).

20 El hígado graso, también denominado esteatosis hepática, se define como una acumulación excesiva de grasa en los hepatocitos. La esteatosis hepática implica la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos, necrosis de hepatocitos, inflamación, obstrucción de pequeñas venas hepáticas y con frecuencia fibrosis con algunas veces evolución a cirrosis, cáncer hepatocelular y muerte de origen hepático (El-Serag H B, et al. Gastroenterology 2004; 126: 460-468, Dam-Larsen S, et al. Gut 2004; 53: 750-5).

25 La prevalencia mundial de la esteatosis hepática es muy alta, se asocia con varios factores tales como alcohol, diabetes, sobrepeso, hiperlipidemia, resistencia a insulina, hepatitis C de genotipo 3, abetalipoproteinemia y algunos fármacos (Bellentani S, et al. Ann. Intern. Med. 2000; 132: 112-7; Levitsky J, Mailliard M E. Semin. Liver Dis. 2004; 24: 233-47). Sin embargo, no hay recomendación estándar para el diagnóstico de la esteatosis hepática. La recomendación normal es medir GGT y ALT y realizar biopsia de hígado para la clasificación y determinación de fases (Bellentani S, et al. Ann. Intern. Med. 2000; 132: 112-7; Levitsky J, Mailliard M E. Semin. Liver Dis. 2004; 24: 233-47; Bravo A A, et al. N. Engl. J. Med. 2001: 344; 495-500). Puesto que la biopsia hepática todavía es un procedimiento invasivo y caro, con errores potenciales de muestreo, es ventajoso tener una prueba que de un buen valor predictivo del nivel de esteatosis hepática en un sujeto.

35 La solicitud de patente internacional WO2006/082500 divulga un método para el diagnóstico de la esteatosis hepática en un sujeto, que comprende estudiar 5 marcadores bioquímicos midiendo los valores de sus concentraciones en el suero o plasma de dicho sujeto. Dichos marcadores son: ApoA1 (apolipoproteína A1), alfa.2-macroglobulina, ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gamma glutamil transpeptidasa) y triglicéridos.

40 La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una enfermedad progresiva del hígado de etiología desconocida caracterizada histológicamente por la acumulación de ácidos grasos, daño a los hepatocitos e inflamación que caracteriza a la hepatitis alcohólica. EHNA es una fase crítica en el proceso que abarca desde la esteatosis hepática a la cirrosis e insuficiencia hepática. Unos antecedentes cuidadosos de la falta de ingesta de alcohol es esencial para establecer este diagnóstico. EHNA es una de las causas más comunes de aminotransferasas elevadas en sujetos remitidos para evaluación a los hepatólogos. La obesidad y la diabetes de tipo 2 están asociadas a EHNA. Dado que la prevalencia de estas enfermedades está en aumento, también se espera que la prevalencia de EHNA aumente y por lo tanto, esta enfermedad se ha convertido en un tema publico emergente en los Estados Unidos así como en otros países.

50 Se cree que EHNA surge de la interacción de muchos genes diferentes y factores del estilo de vida. La evaluación inicial de sujetos que se sospecha que padecen EHNA cuando están presentes, son fatiga y molestias en la zona abdominal superior derecha. La biopsia hepática está indicada en sujetos sintomáticos con aumentos en las aminotransferasas en suero de más de 6 meses de duración. Las características histológicas de EHNA, que son en la mayor parte indistinguibles de las de la hepatitis alcohólica, incluyen infiltración grasa macrovesicular, necrosis hepatocelular y degeneración por hinchamiento, hialina alcohólica y reacción inflamatoria.

60 Como es cierto para otras enfermedades complejas, los factores genéticos que contribuyen al desarrollo de EHNA se pueden identificar más fácilmente combinando estudios en sujetos con EHNA y en modelos animales de la enfermedad. Uno de estos modelos es el ratón deficiente en *MAT1A* (*MAT1A-KO*). Aproximadamente a la edad de 3 meses, los hígados de *MAT1A-KO* tienen histología normal pero son más sensibles a desarrollar esteatosis grave. Estos ratones desarrollan de forma espontánea EHNA y carcinoma hepatocelular aproximadamente a los 8 y 15 meses de edad, respectivamente [Lu SC, 2001, PNAS USA 98, 5560-5565]. El gen *MAT1A* codifica metionina adenosiltransferasa I y III, las principales enzimas responsables de la síntesis de S-adenosilmetionina (SAME) en el hígado. Estudios anteriores concluyeron que los sujetos con cirrosis hepática y hepatitis alcohólica son deficientes

en la síntesis de SAMe; y que el tratamiento con SAMe mejora la supervivencia en sujetos con cirrosis hepática alcohólica.

5 La solicitud de patente internacional WO2008/021192 divulga un método para el diagnóstico, evaluación de la gravedad y/o evaluación de la progresión o regresión de un trastorno de hígado en un sujeto, tal como esteatosis hepática o EHNA. El método comprende determinar una cantidad de uno o más metabolitos lipídicos en muestras de un líquido corporal de un sujeto y correlacionar la(s) cantidad(es) de uno o más metabolitos lipídicos con la presencia del trastorno hepático.

10 El documento US 6631330 divulga conjuntos de marcadores, métodos y kits para diagnosticar y seguir la fibrosis hepática y/o la presencia de lesiones necroinflamatorias hepáticas en un paciente. Dicho método implica el estudio de al menos 4 marcadores bioquímicos seleccionados de α 2-macroglobulina, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gammaglutamil transpeptidasa), γ -globulina, bilirrubina total, albúmina, α 1-globulina, α 2-globulina, apoA1, IL-10, TGF- β 1, Apo2 y apoB. Sin embargo, dicho documento no divulga marcadores
15 útiles para el diagnóstico específico de EHNA.

Poynard Thierry y col. (Poynard Thierry et al., BMC Gastroenterology. 2006; 6(1):34) divulga un método de diagnóstico de EHNA/esteatosis que combina 13 parámetros: edad, sexo, altura, peso y niveles en suero de triglicéridos, colesterol, alfa 2 macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina, gamma-glutamyl-transpeptidasa, transaminasas ALT, AST y bilirrubina total. Dicho método permite la discriminación entre pacientes que tienen EHNA y los que tienen esteatosis pero no EHNA. Sin embargo, dicho método no permite discriminar entre EHNA/esteatosis y otras enfermedades hepáticas.

20 El documento US 2007/037221 divulga marcadores y métodos para diagnosticar una patología hepática incluyendo hepatitis e hígado graso/esteatosis. El método divulgado en este documento se basa en la cuantificación de la glicosilación en proteínas marcadoras y la comparación de los valores obtenidos para la glicosilación de tales proteínas con valores de referencia en sujetos con y/o sin patologías hepáticas.

30 Santos-Gonzalez y col. (Santos-Gonzalez et al., Experimental Gerontology, 2007, 42 (8):798-806) divulga que la alimentación de ratas con una dieta basada en coenzima 010 produce una expresión diferencial de hemopexina, apolipoproteína H, cadena pesada del inter- α -inhibidor H4P, preprohaptoglobina, precursor de la cadena gamma del fibrinógeno, proteína similar a fetuina, precursor de α -1-antitripsina, peroxirredoxina de tipo II, inhibidor 3 de serina proteasa, proteína de unión a vitamina D y ApoAI en plasma.

35 La solicitud de patente internacional WO2004/055520 divulga un método de diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) usando marcadores moleculares. El método consiste en detectar y cuantificar, *in vitro* en una muestra de tejido hepático, los niveles de una proteína que se puede usar como un marcador molecular de EHNA y que se selecciona de apolipoproteína A1, subunidad beta de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, queratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2
40 (isoforma 1), proinhibina 1, metionina adenosil transferasa, deshidrogenasa de acil CoA de cadena larga, proteína que se une a selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas. La invención consiste además en comparar los resultados obtenidos con los valores normales de dichas proteínas en tejido hepático sano. Dicho método se puede usar para diagnosticar EHNA y/o para evaluar el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar EHNA. Sin embargo, este método comprende una biopsia hepática y ningún estudio ha demostrado que se pueda
45 usar un único o un panel de biomarcadores como una alternativa a la biopsia hepática para el diagnóstico de EHNA.

50 Existe, por lo tanto, una necesidad de desarrollar un método de diagnóstico que de un buen valor predictivo del alcance de la esteatosis hepática y/o EHNA en un sujeto, y que fuera lo suficientemente fiable para reducir la necesidad de biopsia hepática.

Compendio de la invención

55 En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para discriminar entre pacientes que padecen EHNA o esteatosis y pacientes que padecen otros tipos de enfermedades hepáticas, que comprende:

- a) detectar y cuantificar en una muestra de dicho sujeto los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- 60 b) comparar los resultados obtenidos en el paso a) con valores de referencia de dichas proteínas o de los genes que codifican dichas proteínas,

en donde,

- (i) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos, o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia para cada una de dicha proteína, o gen y
- (ii) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteínas, o genes,

entonces el sujeto padece EHNA o esteatosis.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seguir el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece EHNA o esteatosis, que comprende:

- a) detectar y cuantificar los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- b) comparar los resultados obtenidos en el paso (a) con valores de referencia de dichas proteínas, o genes que codifican dichas proteínas,

en donde

- (i) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos, o de los genes que codifican dichas proteínas son mayores que los valores de referencia y
- (ii) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia entonces

la terapia administrada a dicho sujeto ha sido eficaz o está siendo eficaz.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para identificar biomarcadores específicos de EHNA y/o esteatosis que comprende:

- a) eliminar la seroalbúmina (HSA) contenida en una muestra de suero de un sujeto que padece dicha enfermedad,
- b) analizar el perfil de proteínas de la muestra de suero obtenida en el paso (a) y de una muestra,
- c) comparar los perfiles de proteínas obtenidos en el paso (b) con un perfil obtenido en condiciones similares de un sujeto control e
- d) identificar aquellas proteínas del perfil obtenido de la muestra del paciente que están presente a niveles sustancialmente diferentes con respecto al perfil obtenido de la muestra del sujeto control

en donde las proteínas identificadas en el paso (d) se identifican como biomarcadores específicos de EHNA y/o esteatosis.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende un conjunto de reactivos, en donde dicho conjunto consiste en reactivos para detectar las proteínas antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma, o los genes que codifican dichas proteínas y, opcionalmente, un reactivo para detectar una proteína de mantenimiento o el gen que codifica dicha proteína de mantenimiento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa un diagrama esquemático del proceso de eliminación e imágenes que muestran una comparación de geles 2D de muestras de suero humano antes (A) y después (B) de la eliminación de la seroalbúmina humana (HSA) por medio de una columna de afinidad. Las cifras en las imágenes de los geles indican la posición de varios marcadores como sigue: 1, albúmina, 2, transferrina, 3, hemopexina (β -1B-glicoproteína), 4, α -1-antitripsina.

La figura 2 es una fotografía que muestra imágenes de geles 2D obtenidos después de correr la misma muestra de suero de EHNA con HSA eliminada en tres experimentos independientes.

La figura 3 es un gráfico que muestra la intensidad relativa de manchas diferenciales ($0,67 < R < 1,5$) esteatosis/control (S/C) y EHNA/control (N/C). Una vez que se analizaron las imágenes de geles 2D del control, esteatosis y EHNA, se detectaron 57 manchas diferenciales y se cuantificaron sus valores de intensidad. Los valores se muestran en las figuras. Las barras cuyo nombre de proteína correspondiente está dentro de una caja, corresponden a manchas diferenciales estadísticamente significativas (prueba de la t de Student) con un intervalo de confianza del 95% ($p > 0,05$). El número total de manchas significativamente diferenciales es 20.

5 La figura 4 muestra 3 ejemplos de análisis por western blot de muestras de suero humanas de E (estatisis), N (EHNA) y C (control) incubadas con anticuerpos específicos para glutatión peroxidasa 3 (panel superior), antitrombina III (panel medio) y factor I del complemento (panel inferior) donde se observa la misma tendencia de regulación positiva o negativa que en la selección estadística del análisis de la imagen de geles 2D.

La figura 5 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 52602 Da y que tiene un pI de 5,25 en geles 2D y que corresponde a antitrombina III.

10 La figura 6 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 59761 Da y un pI de 5,35 en geles 2D y que corresponde al factor citosólico 2 de neutrófilos.

15 La figura 7 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 25400 Da y un pI de 5,56 en geles 2D y que corresponde a glutatión peroxidasa 3.

La figura 8 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 38600 Da y un pI de 5,38-5,56 y que corresponde a haptoglobina beta.

20 La figura 9 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 11900 Da y un pI de 6,61 y que corresponde a la isoforma básica de la haptoglobina alfa 1.

La figura 10 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 16882 Da y un pI de 5,4 y que corresponde a la isoforma ácida de la proteína haptoglobina alfa 2.

25 La figura 11 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 21892 Da y un pI de 5,48 y que corresponde a peroxirredoxina 2.

La figura 12 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 65720 Da y un pI de 5,68 y que corresponde al factor I del complemento.

30 La figura 13 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 16140 Da y un pI de 4,71 y que corresponde a la hemoglobina gamma.

35 La figura 14 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 30778 Da y un pI de 5,48 y que corresponde a apolipoproteína AI.

La figura 15 muestra el espectro de masa por MALDI-TOF de la mancha de proteína que muestra un peso molecular de 51512 Da y un pI de 5,03-5,62 y que corresponde a la cadena gamma del fibrinógeno.

40 Figura 16: Análisis de componentes principales (ACP) de los valores de absorbancia de ELISA. Los datos de ensayos ELISA para 7 proteínas (haptoglobina, factor I del complemento, antitrombina III, apolipoproteína A1, glutatión peroxidasa 3, peroxirredoxina 2 y factor citosólico 2 de neutrófilos) seleccionadas de la lista de 9 biomarcadores candidatos se normalizaron según la concentración de proteína total en suero de cada muestra. Los datos se obtuvieron de muestras de suero de 26 pacientes de EHNA (N) y 69 pacientes de esteatosis con un grado diferente de esteatosis (que variaba de S a S3). Todas las muestras se diagnosticaron por biopsia hepática.

45 Figura 17: Análisis de componentes principales (ACP) de los valores de absorbancia de ELISA para pacientes femeninas. Los datos de ensayos ELISA para 7 proteínas (las mismas que en la figura 16) se normalizaron según la concentración de proteína total en suero de cada muestra. Los datos se obtuvieron de muestras de suero de 11 pacientes femeninas de EHNA (N) y 41 pacientes femeninas de esteatosis con un grado diferente de esteatosis (que variaba de S a S3).

50 Figura 18: Análisis de componentes principales (ACP) de los valores de absorbancia de ELISA para pacientes masculinos. Los datos de ensayos ELISA para 7 proteínas (las mismas que en la figura 16) se normalizaron según la concentración de proteína total en suero de cada muestra. Los datos se obtuvieron de muestras de suero de 15 pacientes masculinos de EHNA (N) y 23 pacientes femeninas de esteatosis con un grado diferente de esteatosis (que variaba de S a S3).

60 Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto un conjunto nuevo de marcadores moleculares presentes en plasma y/o suero que, de forma sorprendente, permiten detectar y/o diagnosticar no sólo EHNA sino también estatisis y, de forma más importante, permiten discriminar entre pacientes que padecen EHNA o esteatosis y pacientes que padecen otros tipos de enfermedades del hígado tal como hepatitis B, hepatitis C, hepatitis autoinmune o cirrosis biliar primaria. El nuevo conjunto de marcadores moleculares se basa en nueve proteínas que dan lugar a un conjunto de once biomarcadores (de aquí en adelante cada biomarcador se considera como una

proteína) que, dependiendo de su nivel de expresión, serán indicativos o no de EHNA y/o esteatosis. El nuevo conjunto de marcadores moleculares comprende las siguientes proteínas: antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica, hemoglobina gamma, apolipoproteína A1 y fibrinógeno gamma. Los pesos moleculares de dichas proteínas se muestran en la Tabla 1

Proteína	MW (Da)	pI
Antitrombina III	52602	5,25
Factor citosólico 2 de neutrófilos	59761	5,35
Glutatión peroxidasa 3	25402	5,56
Haptoglobina cadena completa	45205	
beta	38600	5,38-5,56
alfa 1 (básica)	11900	6,61
alfa 2 (ácida)	16882	5,4
Peroxirredoxina 2	21892	5,48
Componente 1 del complemento	65720	5,68
Hemoglobina gamma	16140	4,71
Apolipoproteína A1	30778	5,48
Fibrinógeno, cadena gamma	51512	5,03-5,62

Básica y ácida se refiere, respectivamente, a la isoforma básica de la alfa 1 haptoglobina (punto isoelectrico = 6.61) y a la isoforma ácida de la alfa 2 haptoglobina (punto isoelectrico = 5.4) ya que ambas cadenas (alfa 1 y alfa 2) presentan varias isoformas diferentes.

Por tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para discriminar entre pacientes que padecen EHNA o esteatosis y pacientes que padecen otros tipos de enfermedades hepáticas, que comprende:

- a) detectar y cuantificar en una muestra de dicho sujeto los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- b) comparar los resultados obtenidos en el paso a) con valores de referencia para los niveles de dichas proteínas o de los genes que codifican dichas proteínas,

en donde,

- (i) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen y
- (ii) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteínas, o genes

entonces el sujeto padece EHNA o esteatosis.

Además, la invención contempla el uso de cada uno de los polipéptidos mencionados anteriormente como biomarcadores para el diagnóstico de EHNA o para la identificación de sujetos con predisposición a padecer EHNA. Por tanto, la invención contempla métodos *in vitro* para el diagnóstico de EHNA y/o esteatosis o para la identificación de sujetos que tienen predisposición a desarrollar EHNA y/o esteatosis que comprende determinar los niveles de al menos una proteína o variante de la misma en donde la proteína se selecciona del grupo de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma en donde

- (i) si los niveles de antitrombina III o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o

- (ii) si los niveles del factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (iii) si los niveles de glutatión peroxidasa 3 o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- 5 (iv) si los niveles de alfa 2 haptoglobina ácida o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (v) si los niveles de haptoglobina beta o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- 10 (vi) si los niveles de peroxirredoxina-2 o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (vii) si los niveles del factor I del complemento o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (viii) si los niveles de alfa 1 haptoglobina básica o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- 15 (ix) si los niveles de hemoglobina gamma o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, variante o gen entonces

el sujeto padece EHNA o esteatosis o tiene predisposición a desarrollar EHNA o esteatosis.

20 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de sujetos según el primer método de la invención incluyen sujetos que bien se sospecha que tienen
 25 infiltración grasa del hígado, o sujetos con aumentos en suero de las aminotransferasas durante un período de tiempo largo (de más de 6 meses de duración) o sujetos que se sospecha que tienen EHNA y/o esteatosis, o sujetos a los que previamente se ha diagnosticado o no EHNA y/o esteatosis, o sujetos que reciben o han recibido previamente un tratamiento anti-EHNA o un tratamiento anti-esteatosis, o sujetos que tienen tejido con función hepática normal, es decir, un tejido determinado, por el experto en las técnicas médicas, que no tiene evidencia de
 30 infiltración grasa del hígado, a menudo acompañado por daño hepatocelular con inflamación. Los métodos para identificar sujetos que se sospecha que tienen EHNA y/o esteatosis pueden incluir exploración física, antecedentes familiares del sujeto, antecedentes del sujeto, biopsia hepática, o un número de tecnologías por imagen tal como ecografía.

35 El término "EHNA" se refiere a esteatohepatitis no alcohólica. Los métodos de diagnóstico para EHNA y la delimitación clínica de los diagnósticos de EHNA son bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas.

El término "esteatosis" (también denominado cambio grasa, degeneración grasa o degeneración adiposa) se refiere al proceso que describe la retención anormal de lípidos dentro de una célula.

40 Las expresiones "niveles de expresión mayores" y "niveles de expresión menores" de una proteína en una muestra comparada con valores de referencia para dicha proteína, como se usa en el presente documento, se entienden como diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de una proteína en la muestra en estudio en comparación con un valor de referencia para los niveles de expresión de dicha proteína. Se entiende que
 45 los niveles de expresión en la proteína son mayores que un valor de referencia para dicha proteína si las diferencias en los niveles de expresión son de al menos el 5%, el 10% o el 20%, más preferido al menos el 50% o puede incluso ser tan alto como el 75% o el 100% del valor de referencia. Más preferido la diferencia en el nivel de expresión es al menos del 200%, es decir, dos veces, al menos el 500%, es decir, cinco veces, o al menos el 1000%, es decir 10 veces en la muestra a ensayar cuando se compara con el valor de referencia.

50 De forma similar, se entiende que los niveles de expresión de la proteína en estudio son menores que los valores de referencia para dicha proteína si los niveles de expresión de la proteína en estudio son al menos el 5%, el 10% o el 20%, más preferido al menos el 50% o puede incluso ser tan bajo como el 75% o el 100% del valor de referencia. Más preferido la diferencia en el nivel de expresión es al menos del 200%, es decir, dos veces, al menos el 500%, es
 55 decir, cinco veces, o al menos el 1000%, es decir 10 veces menores en la muestra a ensayar cuando se compara con el valor de referencia.

La determinación de los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichos polipéptidos permite la discriminación de pacientes que padecen EHNA o esteatosis de pacientes que sufren otras enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune o síndrome de Wilson) pero no permite discriminar
 60 adicionalmente pacientes de EHNA de pacientes de esteatosis. Para este fin, la firma se debe complementar con un biomarcador adicional. En particular, los inventores también han descubierto que la apolipoproteína A1 es una proteína adicional expresada diferencialmente que, cuando se combina con el resto de los marcadores, permite el diagnóstico de esteatosis sin dar a los pacientes de EHNA falsos positivos. Además, los inventores también han
 65

descubierto que el fibrinógeno gamma es una proteína adicional expresada diferencialmente que, cuando se combina con el resto de los marcadores, permite el diagnóstico de EHNA sin dar a los pacientes de esteatosis falsos positivos.

- 5 Por tanto, en una forma de realización particular, el primer método de la invención comprende además detectar y cuantificar la proteína apolipoproteína A1, o el gen que codifica dicha proteína, en donde si la proteína apolipoproteína A1, o el gen que codifica dicha proteína, está disminuido comparado con los valores de referencia, entonces el sujeto padece, o tiene predisposición a desarrollar esteatosis.
- 10 Asimismo, en otra forma de realización particular, el primer método de la invención comprende además detectar y cuantificar la proteína fibrinógeno gamma, o el gen que codifica dicha proteína, en donde si la proteína fibrinógeno gamma, o el gen que codifica dicha proteína, está disminuido comparado con los valores de referencia, entonces el sujeto padece, o tiene predisposición a desarrollar EHNA.
- 15 Además, los biomarcadores adicionales que permiten discriminar entre EHNA y esteatosis también se pueden usar como biomarcadores aislados para el diagnóstico de EHNA/esteatosis o para la identificación de sujetos con predisposición a padecer EHNA/esteatosis. Por tanto, la invención contempla métodos *in vitro* para el diagnóstico de EHNA y/o esteatosis o para la identificación de sujetos que tienen predisposición a desarrollar EHNA y/o esteatosis que comprende determinar los niveles de al menos una proteína o variante de la misma en donde la proteína se
- 20 selecciona del grupo de apolipoproteína A1 y fibrinógeno gamma en donde
- (i) si los niveles de apolipoproteína A1 o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para dicha proteína o gen entonces el sujeto padece esteatosis o tiene predisposición a desarrollar estatosis o
 - 25 (ii) si los niveles de fibrinógeno gamma o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para dicha proteína o gen entonces el sujeto padece EHNA o tiene predisposición a desarrollar EHNA.

30 Como se sabe en la técnica la "similitud" entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus aminoácidos sustitutos conservados de una proteína a la secuencia de una segunda proteína. El grado de identidad entre dos proteínas se determina usando algoritmos y métodos informáticos que son ampliamente conocidos para el experto en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI.nlm.nih.gov Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

35 Las proteínas de la invención pueden estar modificadas postraduccionalmente. Por ejemplo, las modificaciones postraduccionales que están en el ámbito de la presente invención incluyen corte de péptido señal, glicosilación, acetilación, isoprenilación, proteólisis, miristoilación, plegamiento de proteínas y procesamiento proteolítico, etc. Además, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados mediante modificación postraducciona

40 l introduciendo aminoácidos no naturales durante la traducción.

En el contexto de la presente invención, la expresión de una proteína o de un gen que codifica dicha proteína está "regulada por descenso" cuando el nivel de expresión de dicha proteína o gen disminuye comparado con valores de referencia.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión de una proteína o de un gen que codifica dicha proteína está "regulada por aumento" cuando el nivel de expresión de dicha proteína o gen aumenta comparado con valores de referencia.

50 En el contexto del primer método de la invención, se entiende "valores de referencia" como valores del nivel de las mismas proteínas (o de los genes que codifican dichas proteínas) en muestras biológicas de sujetos control, esto es, sujetos sanos o sujetos sin antecedentes clínicos de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Además, los autores de la presente invención también han observado que la firma de biomarcadores descrita en el presente documento permite la discriminación entre esteatosis y EHNA y otras enfermedades hepáticas. Por tanto, también se

55 pueden usar muestras de pacientes que padecen dichas otras enfermedades hepáticas (hepatitis C, hepatitis B, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y síndrome de Wilson) como muestras control para obtener valores de referencia para comparar con los valores de los pacientes en estudio.

60 Para llevar a cabo el primer método de la invención, se obtiene una muestra del sujeto en estudio. El término "muestra" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener del paciente. El método presente se puede aplicar a cualquier tipo de muestra biológica de un sujeto, tal como una muestra de biopsia, tejido (tejido hepático), célula o fluido (suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares).

65 En una forma de realización particular, la muestra es suero o plasma que se puede obtener por métodos convencionales. En otra forma de realización particular, la muestra es suero o plasma con HSA eliminada. El plasma

o suero se puede utilizar directamente para la identificación de los niveles de expresión de las proteínas, o se extrae el ácido nucleico de dicho plasma o suero para determinar los niveles de expresión de los genes que codifican dichas proteínas.

5 La determinación de los niveles de expresión de las proteínas se puede llevar a cabo mediante técnicas inmunológicas tales como por ejemplo, ELISA, western blot o inmunofluorescencia. El western blot se basa en la detección de proteínas previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa mediante la incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunofluorescencia requiere el uso
10 de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión. El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado dan como resultado la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados sobre un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados sobre el soporte y de esta manera, se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorimetría. Por tanto, en una forma de realización preferida, las proteínas se detectan mediante western blot, ELISA, una matriz de proteínas o una electroforesis bidimensional. El experto en la materia apreciará que, si las proteínas que forman la firma específica de EHNA o esteatosis se van a detectar mediante electroforesis bidimensional, el gel bidimensional se debe teñir para detectar los polipéptidos. Se puede usar cualquier método de tinción que sea lo suficientemente sensible para detectar las proteínas que forman la firma e incluye, sin limitación, tinción con plata, tinción con azul de Coomassie, tinción con Spyro Ruby, tinción con colorantes de escuarilio, tinción con colorantes fluorescentes de cianina como se describe en Mujumdar, R. B. et al., (Cytometry, 1989, 10:11-19 y documento US5268486), tinción con colorantes de difluoruro de boro dipirrometeno como se describe en el documento US4774339 y similares.

25 Una vez que se identifican las manchas que muestran diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones, las proteínas que forman la firma se identifican en base a sus pesos moleculares y su punto isoeléctrico. La identidad de las manchas de proteínas encontradas en el gel bidimensional se puede confirmar cortando la mancha, realizando una digestión en el gel y una posterior espectrometría de masas. Los niveles de las proteínas en las manchas seleccionadas se pueden cuantificar usando cualquier técnica conocida tal como densitometría de los geles teñidos y determinación de volumen (intensidad x altura), electroforesis diferencial en gel (DIGE) en donde las proteínas que se van a separar se marcan con fluoróforos antes de su fraccionamiento electroforético y se mezclan después con un patrón interno que representa todas las proteínas en la muestra y que se puede usar para fines de normalización.

35 Las regiones de los geles donde se encuentra la proteína que se expresa diferencialmente se pueden cortar y confirmar la identidad de la mancha de proteína mediante secuenciación directa usando técnicas tales como determinación directa de la masa (MALI-MS) o secuenciación en escalera de péptidos (MALDI-MS/ESI-MS). De forma alternativa, las manchas de proteínas se pueden digerir con cualquier proteasa adecuada o reactivo químico e identificar los péptidos resultantes usando una técnica seleccionada de nano-espray ESI-MS/MS, perfil de masa de péptidos mediante ESI-MS, perfil de masa de péptidos mediante MALDI-MS, secuenciación interna mediante degradación de Edman o secuenciación N-terminal. También se pueden analizar las mezclas de proteínas sin separación previa. Estos procedimientos empiezan con la digestión proteolítica de las proteínas en una mezcla compleja. Los péptidos resultantes con frecuencia se inyectan en una columna de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) que separa péptidos en base a la hidrofobicidad. El HPLC se puede acoplar directamente a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo usando ionización de electrospray. Los péptidos que eluyen de la columna se pueden identificar mediante espectrometría de masa en tándem (MS/MS). Se puede usar el marcaje con etiquetas de isótopos para comparar cuantitativamente la concentración de proteínas entre dos o más muestras de proteínas.

50 En una forma de realización preferida, el análisis de la muestra de proteínas se lleva a cabo mediante digestión trípica en el gel seguida por MALDI-TOF.

55 Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a las proteínas diana con alta afinidad para detectar la cantidad de proteínas diana. Se prefiere sin embargo el uso de un anticuerpo, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

60 Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión de proteína se puede llevar a cabo construyendo una micromatriz de tejidos (TMA) que contiene las muestras del sujeto ensambladas, y determinar los niveles de expresión de las proteínas mediante técnicas de inmunohistoquímica bien conocidas en el estado de la técnica.

65 De forma alternativa, el primer método de la invención se puede poner en práctica determinando los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas citadas o las variantes de las mismas. La determinación de los niveles de expresión de un gen se puede llevar a cabo midiendo los niveles de expresión del ARNm de dicho gen. Para este fin, la muestra se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula,

para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicional. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos que conoce el experto en la materia y disponibles comercialmente. El ARN se extrae después a partir de muestras congeladas o recientes mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica [Sambrook, J., et al., 2001 Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3]. Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

El nivel de expresión se puede determinar usando el ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina, embebida en parafina. El ARNm se puede aislar de una muestra patológica de archivo o una muestra de biopsia que primero se desparafiniza. Un método de desparafinización de ejemplo implica lavar la muestra en parafina con un solvente orgánico, tal como xileno, por ejemplo. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con una solución acuosa de un alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados, incluyen por ejemplo, metanol, etanol, propanoles y butanoles. Las muestras desparafinizadas se pueden rehidratar con lavados sucesivos con soluciones de alcoholes inferiores de concentración decreciente, por ejemplo. De forma alternativa, la muestra se desparafiniza y rehidrata simultáneamente. La muestra se lisa después y se extrae el ARN de la muestra.

Mientras que todas las técnicas de determinación del perfil de expresión génica (RT-PCR, SAGE, o TaqMan) son adecuadas para el uso al realizar los métodos anteriores de la invención, los niveles de expresión de ARNm de los genes se determinan con frecuencia mediante transcripción inversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

En el contexto de la presente invención, el conjunto de biomarcadores divulgado en el presente documento se puede usar para seguir el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece EHNA y/o esteatosis que ha recibido previamente tratamiento anti-EHNA y/o tratamiento anti-esteatosis.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* (de aquí en adelante segundo método de la invención) para seguir el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece EHNA o esteatosis, que comprende:

- a) detectar y cuantificar los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- b) comparar los resultados obtenidos en el paso (a) con valores de referencia para los niveles de dichas proteínas o genes que codifican dichas proteínas,

en donde

- (a) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dichas proteínas son mayores que los valores de referencia y
- (b) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia entonces

la terapia administrada a dicho sujeto ha sido eficaz o está siendo eficaz.

El experto en la materia apreciará que los valores de referencia, como se entiende en el contexto del segundo método de la invención, se refiere a valores de los niveles de expresión de las diferentes proteínas, o los genes que codifican dichas proteínas en un sujeto que padece EHNA o esteatosis y que ha sido tratado con un compuesto control o que no ha sido tratado.

En una forma de realización particular, el segundo método de la invención comprende además detectar y cuantificar la proteína apolipoproteína A1 o el gen que codifica dicha proteína, en donde si la proteína apolipoproteína A1 o el gen que codifica dicha proteína, disminuye en comparación con los valores de referencia, entonces la terapia administrada a dicho sujeto no a sido eficaz o no está siendo eficaz para el tratamiento de la esteatosis.

En otra forma de realización particular, el segundo método de la invención comprende además detectar y cuantificar la proteína fibrinógeno gamma o el gen que codifica dicha proteína, en donde si la proteína fibrinógeno gamma o el gen que codifica dicha proteína, disminuye en comparación con los valores de referencia, entonces la terapia administrada a dicho sujeto no a sido eficaz o no está siendo eficaz para el tratamiento de EHNA.

Además, la invención contempla el uso de cada uno de los diferentes marcadores para seguir el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece EHNA o esteatosis. Por tanto, la invención contempla métodos *in vitro* para seguir el efecto de una terapia administrada a un sujeto que padece EHNA o esteatosis que comprende determinar los niveles de al menos una proteína en donde la proteína se selecciona del grupo de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma en donde

- (i) si los niveles de antitrombina III o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (ii) si los niveles del factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dicha proteína son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- 5 (iii) si los niveles de glutatión peroxidasa 3 o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (iv) si los niveles de alfa 2 haptoglobina ácida o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (v) si los niveles de haptoglobina beta ácida o de los genes que codifican dichas proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dicha proteína, o gen o
- 10 (vi) si los niveles de peroxirredoxina-2 o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (vii) si los niveles del factor I del complemento o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- 15 (viii) si los niveles de alfa 1 haptoglobina básica o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen o
- (ix) si los niveles de hemoglobina gamma o de los genes que codifican dicha proteína son menores que los valores de referencia para cada una de dichas proteína, o gen entonces

20 la terapia administrada a dicho sujeto ha sido eficaz o está siendo eficaz. Los “valores de referencia” corresponden a los de los niveles de expresión de pacientes que padecen EHNA o esteatosis y que no han sido tratados o han sido tratados con placebo.

25 Los términos “EHNA”, “esteatosis”, “muestra”, “sujeto”, “regulado por disminución” y “regulado por aumento” ya se han definido y se pueden aplicar al presente método.

En una forma de realización particular del segundo método de la invención, la muestra es suero o plasma, preferiblemente suero o plasma donde se ha eliminado HSA.

30 En el contexto del segundo método de la invención, “valores de referencia” se entiende como los niveles de las proteínas según la invención (o los genes que codifican dichas proteínas) en una muestra biológica de un sujeto que padece EHNA y/o esteatosis que ha recibido previamente tratamiento anti-EHNA o tratamiento anti-esteatosis.

35 Como entiende el experto en la materia, todos los métodos y técnicas citados previamente para determinar los niveles de expresión de proteínas y genes también se pueden usar en el segundo método de la invención.

En otra forma de realización particular, la detección de proteínas se lleva a cabo mediante western blot, ELISA, una matriz de proteínas o electroforesis bidimensional.

40 También se divulga un método *in vitro* para identificar biomarcadores específicos de EHNA o esteatosis que comprende:

- a) eliminar la seroalbúmina humana (HSA) contenida en una muestra de suero de un sujeto que padece dicha enfermedad,
- 45 b) analizar la composición de proteínas de la muestra de suero obtenida en el paso (a),
- c) comparar la composición de proteínas obtenida en el paso (b) con la composición de proteínas obtenida de un sujeto control, y
- d) identificar aquellas proteínas que se expresan en la composición de proteínas obtenida en el paso (b) a diferentes niveles que en la composición de proteínas obtenida del sujeto control,
- 50

en donde las proteínas identificadas son biomarcadores específicos de EHNA o esteatosis.

55 En el paso (a), el método comprende eliminar la HSA del suero. Una estrategia clásica de eliminación para albúmina implica el uso del colorante hidrofóbico azul de Cibacron, un colorante de clorotriacina que tiene alta afinidad por la albúmina, aunque usar ligandos de anticuerpos de afinidad para HSA produce una eliminación más específica comparada con el método tradicional de eliminación con azul de Cibacron. Los medios de afinidad están hechos de matrices con anticuerpos para la proteína específica unidos covalentemente. Los medios de inmovilización para la eliminación de HSA están disponibles comercialmente, empaquetados como columnas de centrifugación que son compatibles con la centrifugación. Por otra parte, existen kits comercialmente disponibles para la eliminación de HSA de muestras de suero y plasma, tal como el kit Vivapure anti-HSA de Sartorius, Gotinga, Alemania.

60

65 En el paso (b), el método comprende analizar la composición de proteínas de la muestra de suero del sujeto de la que se ha eliminado HSA. Como entiende el experto en la materia, se pueden usar múltiples aproximaciones para identificar la composición de proteínas de una muestra y, en particular, del suero. En un método posible se divulga que las proteínas de la muestra de la que se ha eliminado HSA se fraccionan usando electroforesis en gel. En otro método se divulga que la electroforesis en gel es una electroforesis en gel bidimensional. Otros métodos para la

caracterización de las proteínas presentes en una muestra de proteínas implican la huella peptídica (PMF) es una técnica de identificación de proteínas sensible que comprara las masas de péptidos obtenidos experimentalmente con digeridos teóricos de las proteínas disponibles en las bases de datos. Más recientemente, se ha desarrollado la tecnología de identificación multidimensional de proteínas (MUDPIT) o "shotgun proteomics". Esta técnica difiere de PMF en que se digiere la muestra entera antes de la separación y se procesa la mezcla de péptidos resultante usando cromatografía líquida en 2D y espectrofotometría de masas en tándem (MS/MS). Las secuencias de péptidos se predicen a partir de los espectros de masa de disociación inducida por colisión (CID) observados mediante comparación con bases de datos publicadas. Se divulga que primero se somete el suero a una electroforesis (por ejemplo, electroforesis bidimensional) para separar las proteínas y después se identifican las proteínas usando un espectrofotómetro de masas (véase el ejemplo 1). Los métodos y condiciones para llevar a cabo la electroforesis y la técnica de espectrofotometría de masas son ampliamente conocidas del estado de la técnica.

Una vez que se conoce la composición de proteínas del suero, el paso (c) comprende comparar el perfil de proteínas obtenido en el paso (b) con el perfil de proteínas obtenido de un sujeto control en condiciones similares (es decir, preferiblemente con eliminación de seroalbúmina en paralelo con la muestra a ensayar). En el contexto del método anterior, un "sujeto control" se entiende como un sujeto sano o un sujeto sin antecedentes clínicos de EHNA y/o esteatosis. El paso de comparación se puede llevar a cabo mediante inspección visual de los diferentes perfiles de proteínas. De forma alternativa, si el perfil de proteínas se ha obtenido mediante electroforesis en gel bidimensional, los perfiles de proteínas se pueden comparar usando el software PDQuest.

Por último, el paso (d) del método divulgado incluye la identificación de las proteínas que se expresan diferencialmente entre los perfiles obtenidos en la muestra a ensayar y los perfiles de proteínas de la muestra control. La identificación de esas proteínas que se expresan diferencialmente en la muestra de EHNA/esteatosis con respecto a la muestra control se lleva a cabo usando técnicas estándar e incluye tanto secuenciación directa del N-terminal como por degradación de Edman o espectrometría de masas de una digestión proteolítica de la proteína. La proteína se puede digerir con un proteasa o reactivo químico de elección directamente en el gel o se puede electroeluir y después digerir en un tubo de ensayo. Los péptidos que resultan de la digestión se pueden analizar directamente mediante diferentes técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF o ESI-MS). De forma alternativa, si la complejidad de la mezcla de péptidos no permite el análisis directo por espectrometría de masas, es posible separar los péptidos usando técnicas convencionales. Las técnicas de separación adecuadas, que permiten la separación de una muestra compleja de péptidos en múltiples fracciones, las conoce el experto en la materia e incluyen, pero no están limitadas a isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, HPLC de fase reversa, cromatografía de fase reversa de pares de iones, cromatografía de afinidad y similares. Aunque adecuadas en principio, las técnicas como SDS PAGE, electroforesis en geles bidimensionales, cromatografía de exclusión por tamaño son menos apropiadas para la separación de péptidos de longitud generalmente limitada.

Se han descrito varias tecnologías para separar digeridos peptídicos mediante cromatografía líquida, incluyendo (RP)-HPLC de fase reversa, y cromatografía líquida bidimensional. Para muestras de péptidos obtenidos de digestiones proteolíticas, los planteamientos de 2D-LC son particularmente adecuados para la separación, proporcionando también ventajas significativas con respecto a la automatización y rendimiento. También la electroforesis capilar (CE) es un método adecuado para la separación de péptidos. 2D-LC usa generalmente columnas de intercambio iónico (normalmente, intercambio catiónico fuerte, SCX) acopladas en serie con la columna de fase reversa, operado en una serie de ciclos. En cada ciclo se aumenta la concentración de sal en la columna de intercambio iónico, para eluir los péptidos según su carga iónica en el sistema de fase reversa. En el presente documento, los péptidos se separan por hidrofobicidad mediante por ejemplo, un gradiente con CH_3CN .

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit útil en la ejecución de la metodología descrita en el presente documento. Por tanto, dicho kit comprende un conjunto de reactivos para detectar los niveles de expresión de todas o genes que codifican dichas proteínas según la invención, en donde dicho conjunto consiste en reactivos para detectar las proteínas antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o los genes que codifican dichas proteínas y, opcionalmente, un reactivo para detectar una proteína de mantenimiento o el gen que codifica dicha proteína de mantenimiento.

En una forma de realización particular, el conjunto de reactivos consiste además en un reactivo para detectar la proteína apolipoproteína A1 o el gen que codifica dicha proteína. En otra forma de realización particular, el conjunto de reactivos consiste además en un reactivo para detectar la proteína fibrinógeno gamma o el gen que codifica dicha proteína.

En otra forma de realización particular, los reactivos para detectar las proteínas según la invención, o los genes que codifican dichas proteínas, comprenden,

- (i) un conjunto de ácidos nucleicos capaces de hibridar específicamente con los genes que codifican dichas proteínas, o

- (ii) un conjunto de anticuerpos, o un fragmento de los mismos, capaces de detectar un antígeno, capaz de unirse específicamente a dichas proteínas.

Los ácidos nucleicos capaces de hibridar específicamente con los genes que codifican dichas proteínas son, por ejemplo, uno o más pares de oligonucleótidos cebadores para la amplificación específica de fragmentos de los ARNm (o sus ADNc correspondientes) de los genes que codifican dichas proteínas y/o una o más sondas para la identificación de uno o más genes seleccionados de dichos genes.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de detectar un antígeno, capaces de unirse específicamente a las proteínas según la invención son, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

Dichos reactivos, específicamente, las sondas y los anticuerpos, se puede fijar sobre un soporte sólido, tal como una membrana, un plástico o un cristal, opcionalmente tratados para facilitar la fijación de dichas sondas o anticuerpos sobre el soporte. Dicho soporte sólido, que comprende, al menos, un conjunto de anticuerpos capaces de unirse específicamente a la proteína de la presente invención, o variante de la misma, o sondas que hibridan específicamente con los genes que codifican dichas proteínas, respectivamente, se pueden usar para detectar los niveles de expresión de las proteínas según la invención, o variante de las mismas, o de los genes que codifican dichas proteínas, por medio de la tecnología de matrices.

Los kits de la invención opcionalmente comprende reactivos adicionales para detectar un polipéptido codificado por un gen de mantenimiento o el ARNm codificado por dichos genes de mantenimiento. La disponibilidad de dicho reactivo adicional permite la normalización de las medidas tomadas en las diferentes muestras (por ejemplo, la muestra a ensayar y la muestra control) para excluir que las diferencias en la expresión de los diferentes biomarcadores sean debidas a diferentes cantidades de proteína total en la muestra más que a diferencias reales en los niveles relativos de expresión. Los genes de mantenimiento, como se usa en el presente documento, se refiere a genes que codifican proteínas que se expresan de forma constitutiva y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los genes de mantenimiento preferidos para su uso en la presente invención incluyen β -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosómica de 18S, ciclofilina, GAPDH y actina.

El siguiente ejemplo se proporciona como meramente ilustrativo y no se debe considerar como limitante del ámbito de la invención.

Ejemplo 1

Detección de biomarcadores de EHNA/esteatosis en suero

Muestras

Se obtuvieron 61 muestras de suero humano de diferentes centros de salud:

Control (15 muestras)
 Esteatosis (15 muestras)
 EHNA (22 muestras)
 Hepatitis C (16 muestras)
 Hepatitis B (3 muestras)
 Cirrosis biliar primaria (3 muestras)
 Hepatitis autoinmune (2 muestras)
 Síndrome de Wilson (1 muestra)

Las muestras se clasificaron en 8 categorías diferentes: Controles (**C**) para muestras de donantes sanos, sujetos con esteatosis (**S**), sujetos con EHNA (**N**), Hepatitis C (**VHC**), Hepatitis C (**VHC**) and hepatitis autoinmune (**AH**) así como cirrosis biliar primaria (**CI**) and síndrome Wilson (**W**).

Eliminación de HSA

Para eliminar la HSA, mejorando así la separación por electroforesis 2D, se usó un kit comercial basado en una resina de afinidad (kit Vivapure anti-HSA, de Sartorius, Gottinga, Alemania) que contiene fragmentos de anticuerpos generados contra la albúmina humana. Se requirió un volumen pequeño (20 μ l) de suero para obtener aproximadamente 300 μ g de proteínas de suero sin HSA con este procedimiento. La figura 1 muestra un dibujo esquemático del proceso de eliminación e imágenes de geles de 2D que muestran el efecto de la eliminación de HSA sobre la resolución y sensibilidad.

Diseño experimental

Las muestras de suero en las que se había eliminado la HSA se diluyeron en un tampón que contenía urea 9 M, tiourea 2 M y DTT 65 mM así como biolitos (Bio-Rad) para desnaturalizar y reducir las proteínas. Se cargaron las muestras en urea en Readystrips (Bio-Rad) que variaban entre pl 5 y pl 8 (primera dimensión, isoelectroenfoque o separación dependiente del punto isoelectrico). El isoelectroenfoque se llevó a cabo usando el siguiente gradiente de voltaje:

S1 300V 0,01H
 S2 300V 3H (lineal)
 S3 600V 6H (lineal)
 S4 600V 3H
 S5 2000V 7H (lineal)
 S6 2000V 3H
 S7 3500V 7H (lineal)
 S8 3500V Mantenido

Después de equilibrar las tiras de forma secuencial en tampón que contenía ditiotreitolo (reducción) y yodoacetamida (alquilación), se colocaron en la parte superior de un gel de poli(acrilamida) al 12,5% de 18 x 20 cm para la segunda dimensión o SDS-PAGE (separación dependiente del tamaño). Los geles se corrieron durante la noche a 80-85 V y después de detener la electroforesis, se fijaron (etanol al 10%, ácido acético al 7%) y se tiñeron durante la noche usando colorante fluorescente SYRO RUBY. Se recogieron las imágenes de los geles en un escáner láser UV-visible Typhoon TRIO con una resolución e intensidad adecuadas para posterior análisis de las imágenes. La figura 2 muestra algunos ejemplos de imágenes de geles 2D.

De más 100 imágenes de geles 2D, se seleccionaron las siguientes series para el análisis de las imágenes:

Muestra del sujeto	Nº de imágenes
Control	13 imágenes
esteatosis	13 imágenes
EHNA	13 imágenes
Hepatitis C	8 imágenes
Hepatitis B	2 imágenes
cirrosis biliar primaria	3 imágenes
hepatitis autoinmune	2 imágenes
síndrome Wilson	1 imagen

Una vez que se completó el análisis usando el software PDQuest (Bio-Rad), 465 manchas coincidían para todos los miembros de las imágenes de gel seleccionadas y se hizo la media de los valores de volumen (intensidad x altura) para cada mancha en cada grupo. El análisis estadístico de los datos permitió la identificación de las manchas variables más significativas en cada grupo y la razón de la variación de volumen.

Se obtuvo una lista preliminar de 57 manchas que variaban en muestras de esteatosis y/o EHNA con respecto a los controles por encima de 1,5 veces ($0,67 < R < 1,5$). Algunas de las manchas eran además significativas según la prueba de la t de Student con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Se identificaron las 57 manchas usando un espectrómetro de masas QtoFPremier (MALDI-TOF) (Waters) y se dedujo la lista de las proteínas reguladas por descenso o por aumento para esteatosis y/o EHNA. La figura 3 muestra las 57 manchas seleccionadas con los valores de volumen de manchas de esteatosis y EHNA relativos a las manchas control (razón) y las manchas estadísticamente significativas (intervalo de confianza >95%, 20 manchas dentro de cajas). La tabla 2 muestra las razones para todas las enfermedades analizadas así como los nombres de las proteínas identificadas para cada mancha (estadísticamente significativa, prueba de la t de Student $IC > 95\%$, los nombres de proteínas que muestran expresión diferencial se muestran en **negrita** y *cursiva*).

	Manchas	rS/C	rN/C	rVHC/C	rVHB/C	rCI/C	rAH/C	rWC
Hbgamma	2030	4,17678	5,93244	0,861637	37,9299	0,489984	1,711858	0,07899
Hptalfa1	3004	1,016211	1,284872	0,498559	2,3499	0,306767	0,714451	0,00154
HPTalfa2	3024	2,52897	1,99276	0,018457	0,029508	0,042009	0,01928	0,009405
ApoAI	3202	0,332118	0,79358	0,889487	2,3963	0,615647	1,364215	1,205432
Ig kappa región C + G/DF8	3207	0,911984	1,953164	0,798343	0,109482	0,508817	0,123324	1,122501
NCF2	3214	0,197516	0,280118	0,208336	0,638786	0,020785	0,05293	0,048338
ApoAI	3216	0,370393	0,700118	0,60698	1,582425	0,622408	1,428603	1,426553
IgkappaC	3217	0,93746	1,015507	0,941966	0,930669	2,465818	0,506627	2,204316
HPTbeta	3419	2,00976	1,359743	1,001386	1,529811	1,015394	1,694266	1,20344
CD5AL	3425	0,612306	0,585172	0,565443	0,492692	0,660117	0,530441	0,749935
HPX	3515	0,779672	1,182861	0,172742	0,445007	0,125876	0,05927	0,01892
HPX	3519	0,934131	1,532233	0,577204	0,297356	1,844452	0,052051	0,969104
ATIII	3607	0,348597	0,597348	1,361655	1,197657	1,160797	2,569674	2,831215
Igalfa1	3615	0,414291	1,077545	1,23226	1,908931	2,504596	2,318809	2,569273
HPTalfa2	4002	2,42003	2,18066	0,480369	1,27768	0,646082	1,156504	1,070115
TTR	4006	0,593791	0,887222	0,476519	0,494295	0,112503	0,246381	0,598642
PRDX2	4123	1,449252	5,641456	1,032956	0,211585	2,416363	0,792459	1,048726
ApoAI	4209	0,239637	0,917809	0,747629	0,713243	0,381734	0,296607	1,265596
GPX3	4226	0,479457	0,424715	1,67135	3,067544	1,106753	0,092699	0,160385
HPTbeta	4312	1,420725	1,323721	0,720157	1,708162	0,806802	1,062643	0,521904
TTR+ CFHRP-2	4313	0,437717	1,843697	1,94656	2,88039	1,554365	2,05976	5,65039

HPTbeta	4323	2,98824	1,631314	0,643677	0,101596	1,944521	0,049711	0,051575
FIB gamma	4505	0,552395	0,34343	0,069883	0,086219	0,130087	0,0503	0,007645
FIBgamma	4510	0,934751	0,373868	0,245329	0,161226	0,428386	0,069562	0,026057
FIBgamma	4511	1,326769	0,542664	0,02156	0,079562	0,034938	0,007386	0,015858
	4512	0,692484	0,928675	0,17648	0,508077	0,645766	0,156131	1,803761
FIBgamma	4521	2,69552	0,457352	0,860682	1,526751	1,602774	3,938452	5,99768
HPTbeta	5307	2,172608	0,932389	0,71206	0,945968	1,143297	0,919495	0,199682
CFH	5314	1,374074	1,2616	0,517699	0,790349	0,96134	0,869203	1,916339
CFH	5315	0,968646	0,394481	0,09703	0,054254	0,212841	0,05634	0,474371
HRP	5318	1,558853	0,653903	0,091667	1,268773	0,50194	0,046886	0,766567
	5435	1,157171	1,017219	0,481127	0,986611	0,557156	0,124864	1,15688
CFHRP	5436	1,157171	1,017219	0,481127	0,986611	0,557156	0,124864	1,15688
FIBgamma	5501	2,849472	0,553276	0,116016	0,088159	0,055168	0,056042	0,059974
	5504	1,122295	0,677911	0,321402	0,696575	0,243028	0,058474	0,025352
	5512	1,514354	1,166873	0,907987	1,336234	1,772513	0,494622	3,167091
IgmuC	5517	0,530257	0,710393	0,956713	0,555345	0,940076	0,993653	1,351399
CFI	5530	2,67753	1,912225	1,292514	1,771203	1,181958	1,891634	5,409569
Igalfa1	5605	0,36685	0,582331	2,144728	0,945194	2,328278	1,76924	0,121703
HPX+HSA	5613	1,561869	1,722267	2,202717	4,626885	1,275193	1,116944	5,146662
SEROALBUMINA	5617	0,541096	0,750494	2,221244	1,298469	0,62261	0,40645	0,21954
NAMLAA	5717	1,276513	0,774393	0,866201	1,004599	0,800194	0,153058	0,323432
HPTalfa2	6004	1,682257	1,468368	0,225597	0,540693	0,582706	0,850689	1,097599
Fic3	6303	1,875355	1,580008	1,566837	2,303757	2,054376	0,71319	0,083056
Fic3	6305	1,412239	1,772834	2,438328	4,313461	1,793937	0,880672	0,252341
	6407	0,642189	1,327056	1,560591	0,231498	1,132184	0,307835	1,153343
Igmu C r	6535	0,431846	0,556188	0,620767	0,478546	0,647416	0,353063	0,408121
HPTalfa1	7033	15,81556	22,65297	3,119688	0,201782	1,478119	0,097801	0,040303
HPTalfa2	7111	0,998853	2,550083	0,031844	0,44442	0,061244	0,072659	0,035634
ZFP223	7213	0,417079	0,632161	1,107439	0,718788	1,020944	2,007345	0,014172
CFC4A	7305	0,417079	0,632161	1,107439	0,718788	1,020944	2,007345	0,014172
	7307	2,53267	1,628774	0,603094	1,310049	0,281453	0,224817	0,175088
	7309	1,558798	0,989561	0,107686	0,121385	0,407623	0,265313	0,059652
CFC4A	7311	1,205916	1,026588	0,31085	0,943656	0,222958	0,06398	1,113711
CFC4A	7312	1,139416	1,865986	0,534967	0,041573	0,571087	0,011803	0,027016
HPTbeta	7404	0,511325	0,68532	0,446223	0,32842	0,06516	0,294217	0,601495

Tabla 2

- 5 En un segundo paso, se compararon los valores de volumen de las manchas variables en los geles de esteatosis y EHNA con los valores para las mismas manchas en el resto de los grupos analizados mediante electroforesis en 2D (hepatitis C y B, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune y síndrome de Wilson). Se eligieron las manchas que mostraban diferencias en intensidad con respecto al resto de los grupos para una siguiente ronda de selección. Se detectaron 11 manchas que mostraban una tendencia cuantitativamente diferente en esteatosis y/o EHNA cuando se comparaban con el resto de los grupos. Las 11 manchas y sus cambios en expresión (disminuida N y disminuida
- 10

S significa que la proteína disminuye sólo en EHNA o sólo en esteatosis cuando se compara con el control) se indican en la tabla 3.

5 Tabla 3: proteínas que muestran una expresión diferencial en muestras de esteatosis frente a control y en muestras de EHNA frente a control (columna izquierda) con indicación de su cambio relativo en expresión (aumentada o disminuida) (columna derecha).

Control/esteatosis y Control/EHNA Diferencial	
Antitrombina III	Disminuida
Factor citosólico 2 de neutrófilos	Disminuida
Glutación peroxidasa 3	Aumentada
Apolipoproteína AI	Disminuida S
Alfa 2 Haptoglobina ácida	Aumentada
Haptoglobina beta	Aumentada
Peroxirredoxina-2	Aumentada
Fibrinógeno gamma	Disminuida N
Factor I del complemento	Aumentada
Alfa 1Haptoglobina básica	Aumentada
Hemoglobina gamma	Aumentada

10 **Validación**

La validación de las proteínas seleccionadas como biomarcadores de EHNA se llevó a cabo usando la técnica de western blot, un procedimiento basado en afinidad que combina la separación electroforética de proteínas con la detección específica por medio de anticuerpos generados contra proteínas específicas.

15 Las pruebas de afinidad permiten decidir usar anticuerpos comercialmente disponibles para probar su avidéz y especificidad como un paso previo para el uso de aquellos anticuerpos en una técnica más sensible y cuantitativa denominada ELISA (Enzimoimmunoanálisis de absorción).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para discriminar entre pacientes que padecen EHNA o esteatosis y pacientes que padecen otros tipos de enfermedades hepáticas, que comprende:

- 5 a) detectar y cuantificar en una muestra de dicho sujeto los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- 10 b) comparar los resultados obtenidos en el paso a) con valores de referencia de los niveles de dichas proteínas o de los genes que codifican dichas proteínas,

en donde,

- 15 (i) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia para cada una de dicha proteína, o gen y
- (ii) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y variantes son mayores que los valores de referencia para cada una de dichas proteínas, o genes
- 20

entonces el sujeto padece EHNA o esteatosis.

25 2. Método según la reivindicación 1 que comprende además detectar y cuantificar en el paso (i) los niveles de apolipoproteína A1 o del gen que codifica dicha proteína, en donde si dichos niveles son menores que los valores de referencia, entonces el sujeto padece, o tiene predisposición a desarrollar esteatosis.

30 3. Método según la reivindicación 1 que comprende además detectar y cuantificar en el paso (i) los niveles de fibrinógeno gamma o del gen que codifica dicha proteína, en donde si dichos niveles son menores que los valores de referencia, entonces el sujeto padece, o tiene predisposición a desarrollar EHNA.

35 4. Un método *in vitro* para seguir el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece EHNA o esteatosis, que comprende:

- a) detectar y cuantificar los niveles de antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas y
- 40 b) comparar los resultados obtenidos en el paso (a) con valores de referencia de los niveles de dichas proteínas o de los genes que codifican dichas proteínas o,

en donde,

- 45 (i) si los niveles de las proteínas antitrombina III y factor citosólico 2 de neutrófilos o de los genes que codifican dichas proteínas son mayores que los valores de referencia y
- (ii) si los niveles de las proteínas glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o de los genes que codifican dichas proteínas son menores que los valores de referencia
- 50 entonces

la terapia administrada a dicho sujeto ha sido eficaz o está siendo eficaz.

55 5. Método según la reivindicación 4, que comprende además detectar los niveles de la proteína apolipoproteína A1 o del gen que codifica dicha proteína en donde si dichos niveles son menores que un valor de referencia, entonces la terapia administrada a dicho sujeto no ha sido eficaz o no está siendo eficaz para el tratamiento de esteatosis.

60 6. Método según la reivindicación 4 que comprende además detectar los niveles de fibrinógeno gamma o del gen que codifica dicha proteína en donde si dichos niveles son menores que un valor de referencia, entonces la terapia administrada a dicho sujeto no ha sido eficaz o no está siendo eficaz para el tratamiento de EHNA.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra es suero, plasma o suero o plasma donde se ha eliminado HSA.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los niveles de las proteínas se determinan mediante western blot, ELISA o electroforesis bidimensional y tinción.
- 5 9. Un kit que comprende un conjunto de reactivos, en donde dicho conjunto consiste en reactivos para detectar las proteínas antitrombina III, factor citosólico 2 de neutrófilos, glutatión peroxidasa 3, alfa 2 haptoglobina ácida, haptoglobina beta, peroxirredoxina-2, factor I del complemento, alfa 1 haptoglobina básica y hemoglobina gamma o los genes que codifican dichas proteínas y, opcionalmente, un reactivo para detectar una proteína de mantenimiento o el gen que codifica dicha proteína de mantenimiento.
- 10 10. Kit según la reivindicación 9 que comprende además un reactivo para detectar la proteína apolipoproteína A1 o para detectar el gen que codifica dicha proteína.
- 15 11. Kit según la reivindicación 9 que comprende además un reactivo para detectar la proteína fibrinógeno gamma o el gen que codifica dicha proteína.
12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el conjunto de reactivos se selecciona del grupo de:
- 20 a) Un conjunto de ácidos nucleicos capaces de hibridar específicamente con los genes que codifican dichas proteínas y
b) Un conjunto de anticuerpos, o fragmentos de los mismos capaces de unirse específicamente a dichas proteínas.

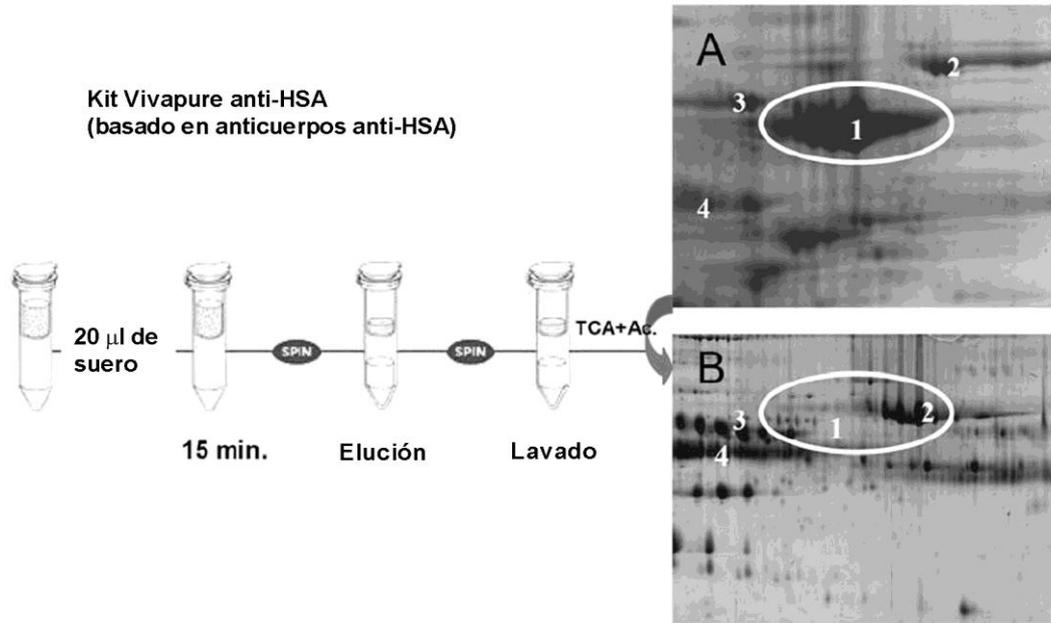


Figura 1

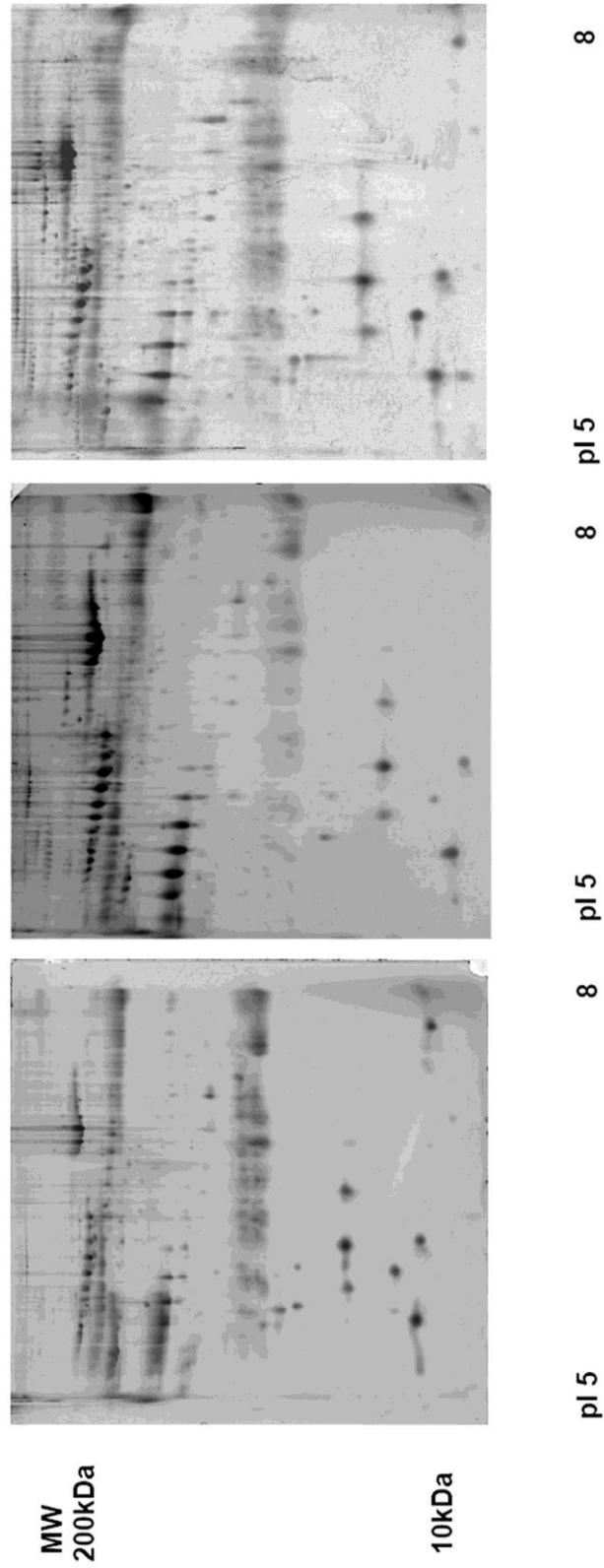


Figura 2

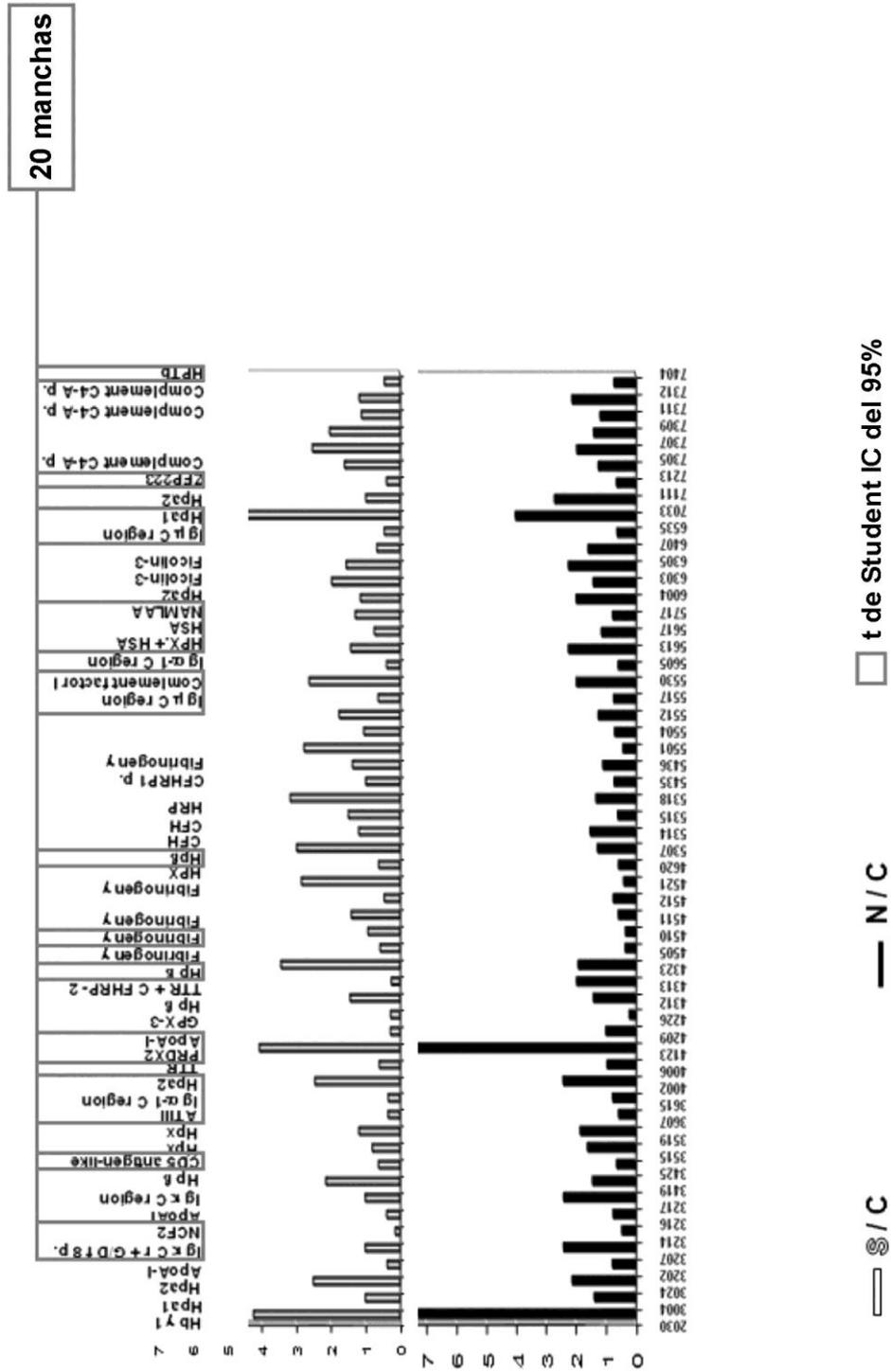


Figura 3

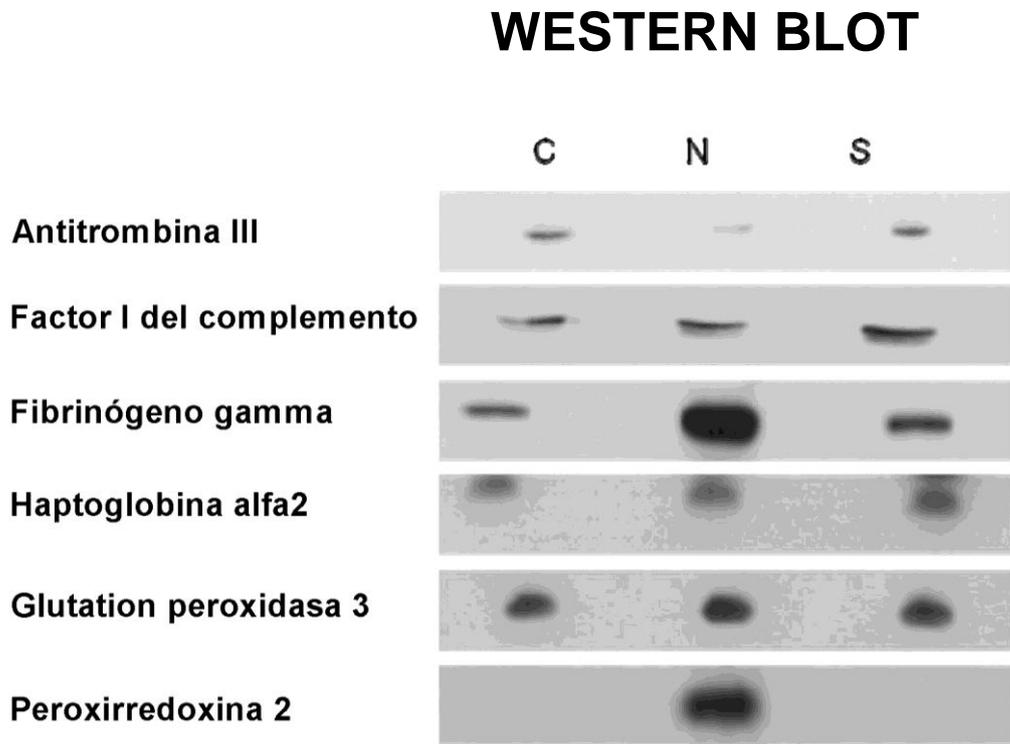


Figura 4

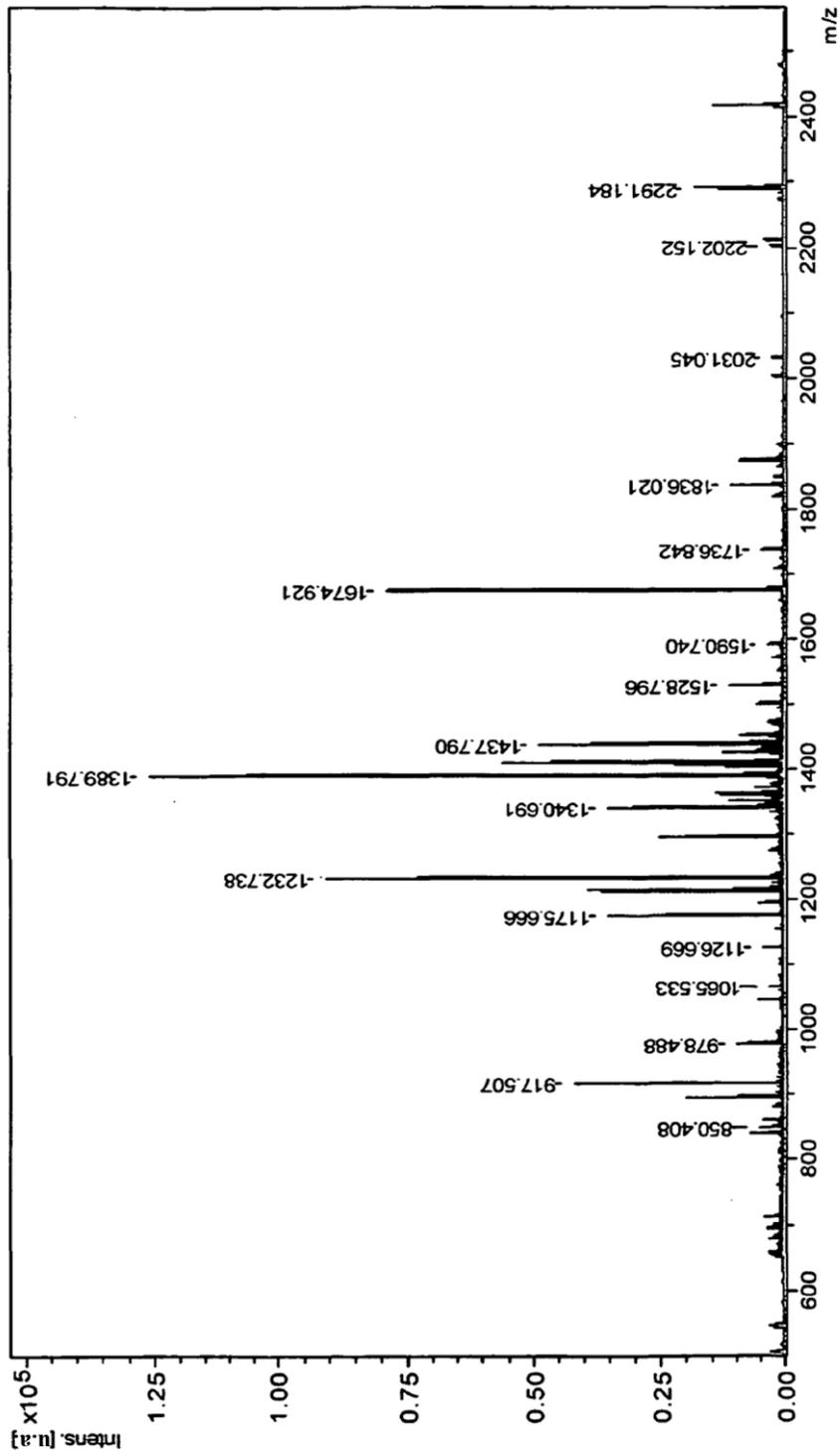


Figura 5

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad Res.	Área
850.408	4762.54	36.9	3456	5523	1214
860.469	3731.88	28.1	4945	6232	876
896.448	19215.97	131.1	11835	6096	4961
917.507	39897.29	284.2	18865	6198	11363
978.488	9241.38	75.2	2076	6686	2743
1065.533	2579.96	22.8	513	6043	880
1126.669	4021.58	33.3	2657	6308	1421
1175.666	34310.66	171.6	52381	6082	14440
1193.647	4610.35	20.0	2733	6830	1674
1211.655	35111.39	148.2	53912	5808	15962
1225.648	2071.88	9.4	1032	5915	873
1232.738	92362.44	432.3	41176	5339	46681
1294.674	24795.78	139.9	52706	5797	12673
1340.691	33778.89	99.0	12380	5239	20541
1361.674	14321.31	34.4	2234	6159	7547
1389.791	127770.83	312.3	60117	5546	80463
1405.764	17749.93	48.2	2561	5070	11466
1409.684	54400.92	152.2	131003	5674	33615
1425.668	11459.17	36.1	16502	6336	6518
1437.790	47043.07	165.4	194527	6008	30075
1441.674	5847.57	21.4	5659	5547	3505
1451.747	8423.16	34.0	12872	6203	4939
1528.796	10738.53	76.5	34609	6125	6975
1590.740	2991.19	28.5	13323	6002	2170
1674.921	79209.87	847.2	100210	5334	74131
1736.842	4709.18	53.3	46413	6282	3858
1836.021	9901.08	93.0	43388	6277	9788
1848.947	1941.93	18.4	5538	6301	1721
1864.941	1120.26	11.2	3242	5696	1086
1874.963	8133.67	84.5	33686	6304	8161
2003.050	1956.16	30.2	4830	520	2435
2031.045	2050.22	32.6	3625	6785	2184

Figura 5 (cont.)

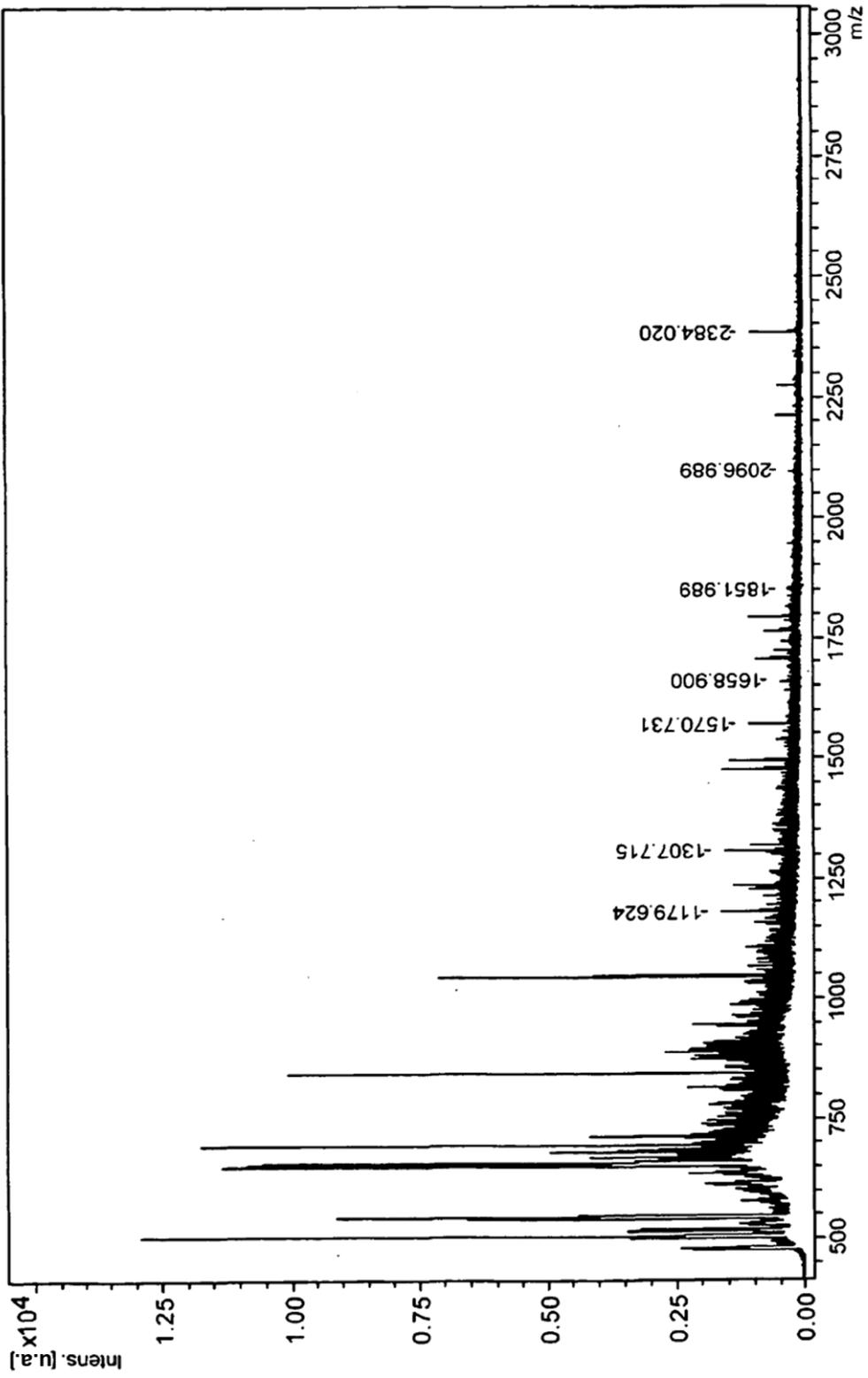


Figura 6

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
1179.624	1201.99	11.8	1885	6512	443	
1234.662	1008.02	10.5	343	5038	618	
1307.715	1240.21	14.1	2465	5732	593	
1570.731	742.10	10.6	959	5134	503	
1658.900	495.00	3.5	29487	5807	228	
1835.973	323.00	2.3	34744	8099	188	
1851.989	324.00	2.3	9558	3603	158	
2096.989	261.00	1.9	10165	5626	122	
2384.020	598.77	19.9	1743	7306	726	

Figura 6 (cont.)

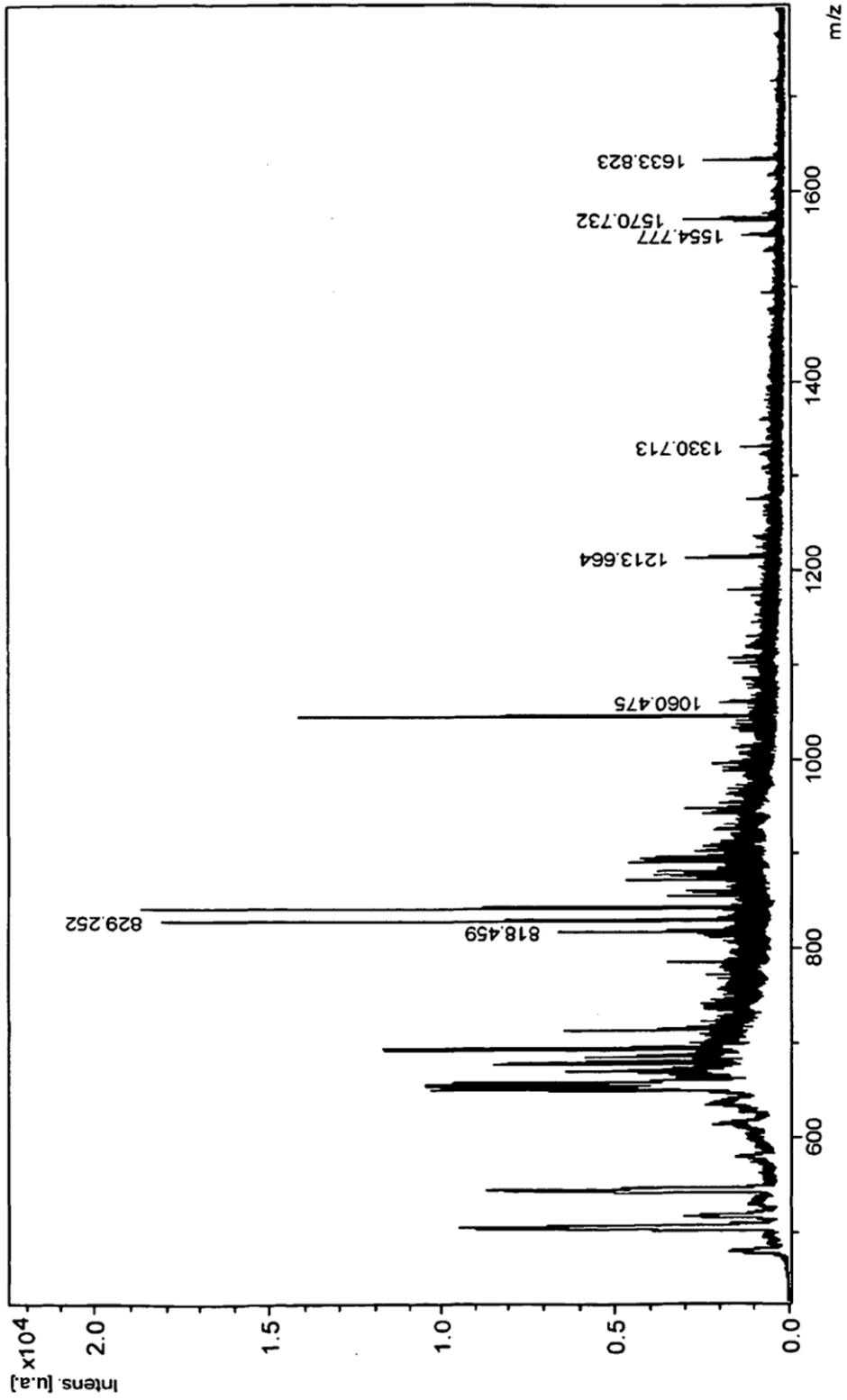


Figura 7

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
818.459	5033.20	25.5		4844	5298	1235
829.252	16333.72	81.6		34622	5597	4374
1060.475	1225.27	8.8		847	3944	526
1213.664	2310.30	19.8		2576	5399	1127
1330.713	914.48	9.2		1023	5220	511
1554.777	911.97	10.4		3252	4683	731
1570.732	2144.78	25.0		740	5172	1510
1633.823	2102.56	26.7		5654	5470	1693.144

Figura 7 (cont.)

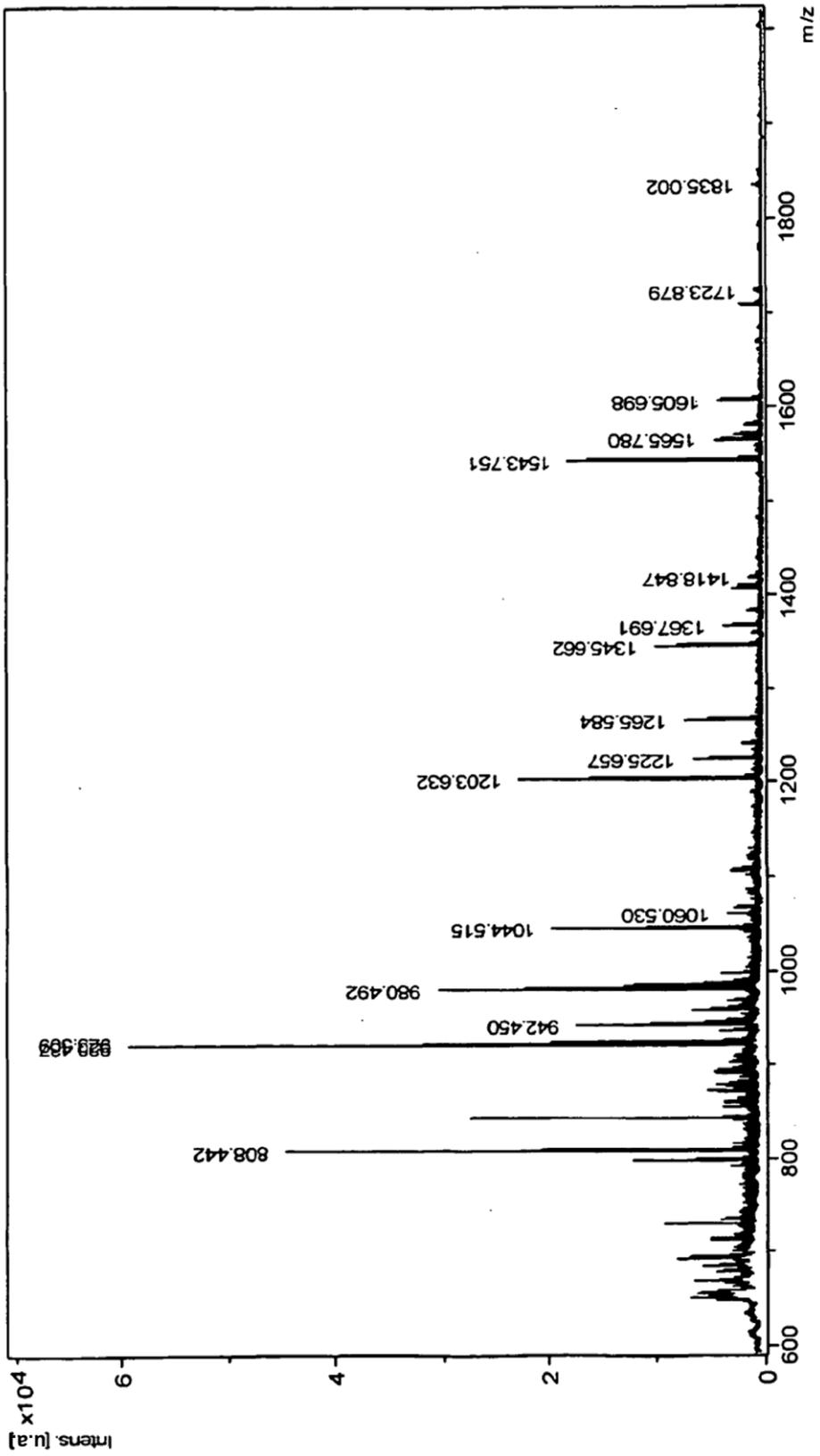


Figura 8

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
808.442	40408.16	184.7		16715	4986	10916
920.437	55739.16	206.7		47133	5321	17281
923.509	16063.06	59.9		12103	5449	4732
942.450	15161.58	59.5		5110	5521	4924
980.492	26940.29	117.8		24367	5039	9814
1044.515	5297.23	31.8		448	4184	2523
1060.530	2253.55	14.0		1136	5252	751
1203.632	21923.41	158.0		75629	5888	10064
1225.657	5266.32	40.0		17917	6800	2265
1265.584	6497.74	53.9		28090	5867	3082
1345.662	9605.99	81.1		48268	5773	5084
1367.691	3115.34	25.9		6656	6497	1630
1418.847	1082.74	9.8		849	5873	603
1543.751	17341.40	165.1		15768	5752	11962
1565.780	3846.41	37.4		6122	6983	2527
1605.698	3877.86	40.6		5298	6050	2774
1723.879	621.96	7.7		1189	5154	542
1835.002	593.42	8.3		1415	6236	584

Figura 8 (cont.)

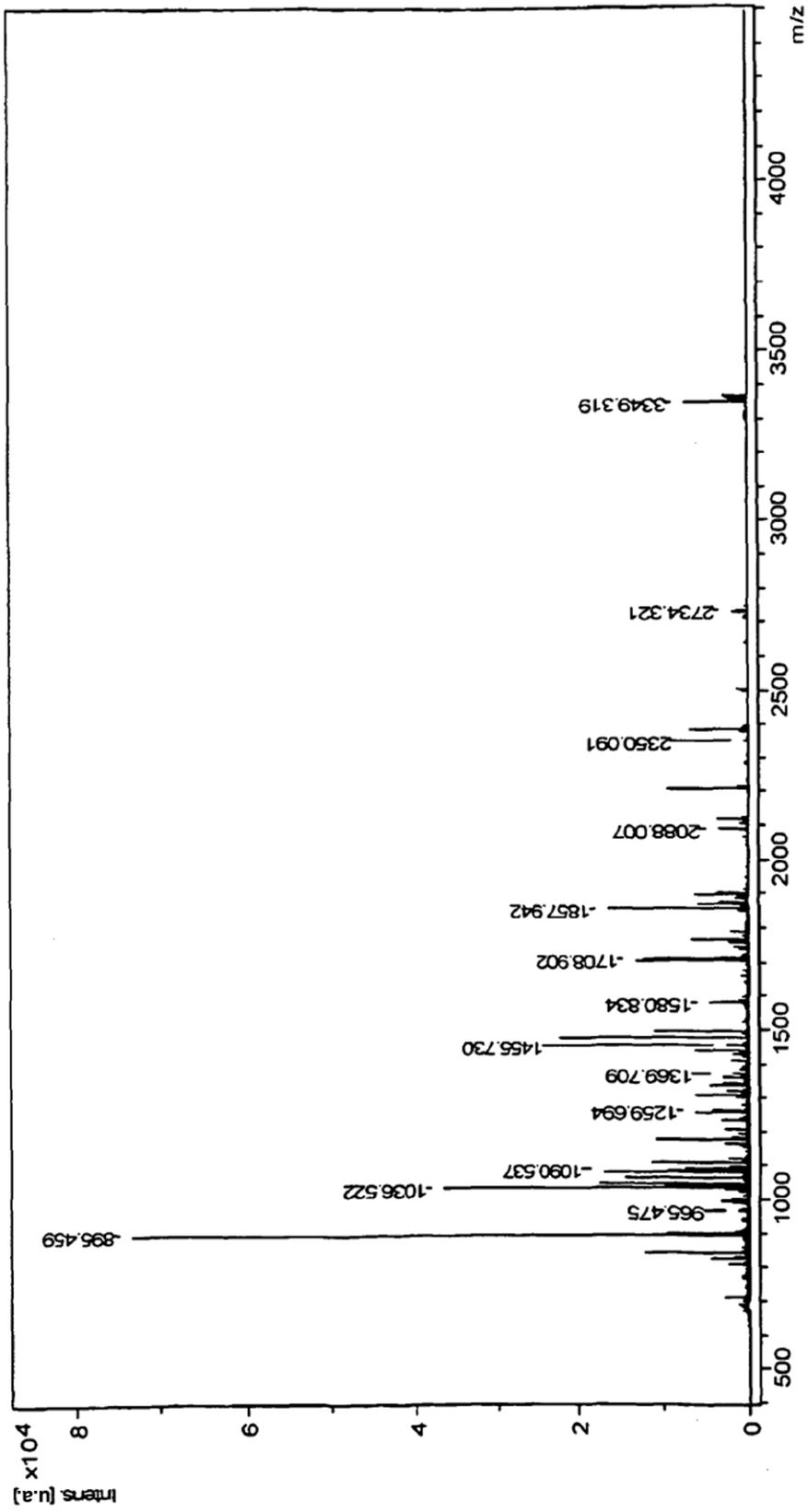


Figura 9

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área	Intens Rel.	Pico fondo
895.459	72509.12	822.7	56259	5018	22749.03	100	falso	
965.475	1247.52	16.8	3403	6557	338.2118	2	falso	
999.470	3154.57	35.9	2597	5751	1032.219	4	falso	
1029.584	2432.55	23.2	3379	6094	774.6647	3	falso	
1036.522	37293.91	343.7	14367	5922	13425.53	51	falso	
1064.605	14404.78	137.5	13398	5767	5211.092	20	falso	
1090.537	8998.50	96.1	61413	6102	3200.419	12	falso	
1096.534	1816.05	20.0	2361	5749	624.8847	3	falso	
1203.635	2673.84	34.8	3216	6650	1013.9	4	falso	
1259.694	5862.48	76.3	15488	6293	2521.948	8	falso	
1338.694	4310.56	54.7	20113	6536	1973.532	6	falso	
1369.709	1584.39	19.9	2403	6843	733.5646	2	falso	
1455.730	2584.06	27.9	4899	6947	1315.563	4	falso	
1580.834	4612.27	77.8	11310	6728	2834.945	6	falso	
1708.902	10950.45	154.7	13281	6221	8474.039	15	falso	
1757.928	2227.95	28.4	13072	7663	1529.029	3	falso	
1857.942	15825.88	223.8	55460	6989	13458.14	22	falso	
1871.968	5612.08	84.5	39054	7567	4427.423	8	falso	
1885.976	1493.80	24.0	2394	8334	1187.066	2	falso	
1897.942	5558.61	95.2	30612	7647	4618.176	8	falso	
1913.934	501.74	9.4	766	6159	437.0261	1	falso	
2064.156	413.13	11.0	2339	7291	365.6258	1	falso	
2088.007	2896.18	77.5	6017	8057	2471.372	4	falso	
2109.073	723.03	19.5	3176	6975	661.649	1	falso	
2120.088	2818.55	76.4	16481	8268	2394.823	4	falso	
2350.091	493.85	17.0	2645	8373	468.8469	1	falso	
2378.229	440.71	14.8	1807	7217	470.2363	1	falso	
2394.244	474.99	16.4	1154	9089	467.2589	1	falso	
2734.321	1175.23	67.8	2169	9143	1274.475	2	falso	
3349.319	3610.82	297.2	20472	9530	5258.808	5	falso	
3363.335	1386.57	115.4	6618	10528	1882.22	2	falso	

Figura 9 (cont.)

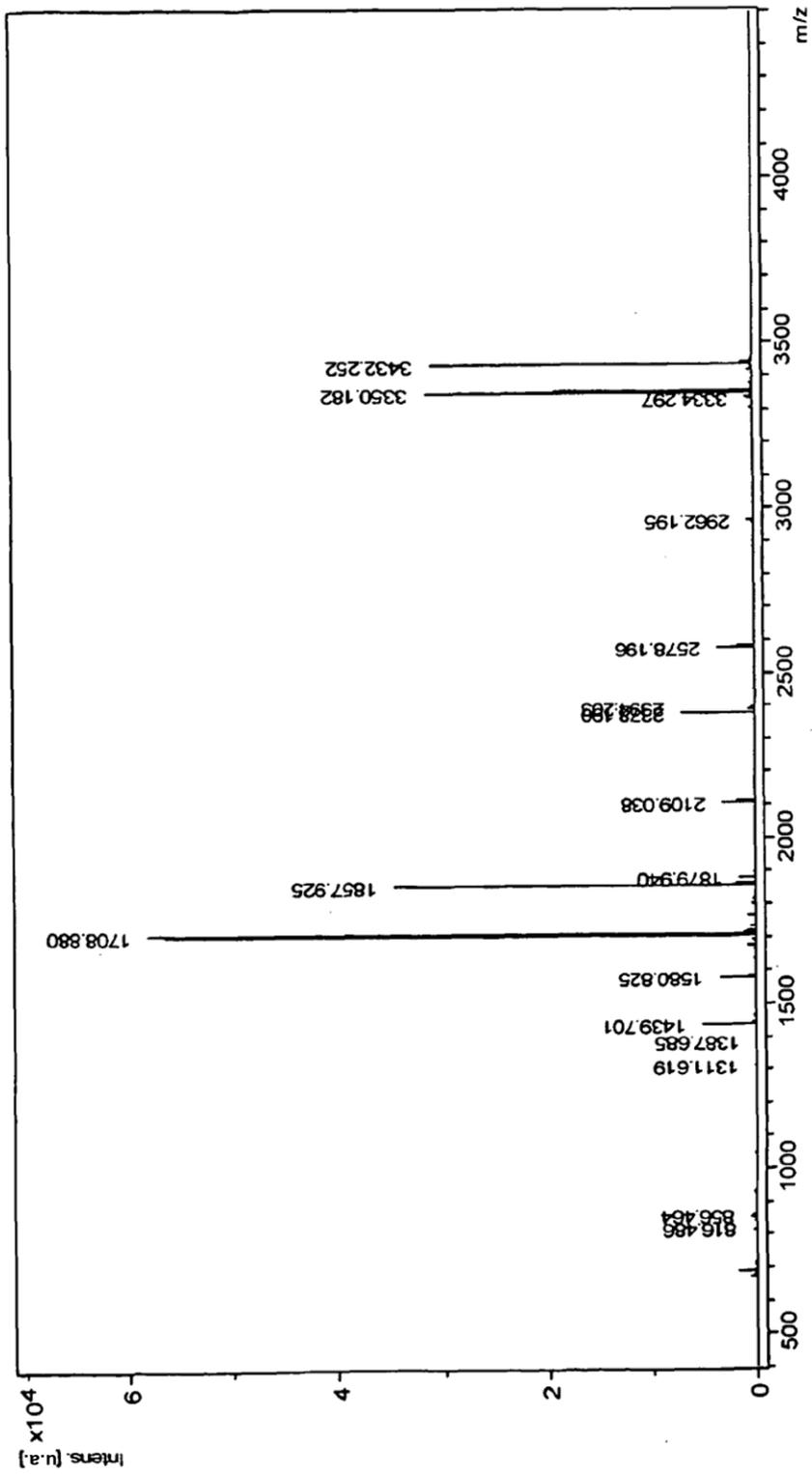


Figura 10

m/z	Intens.	SN	Fac. Calidad Res.	Intens Rel.	Pico fondo
816.486	326.10	12.7	1797	6670	1
856.464	277.44	11.2	588	6053	0 falso
1311.619	196.16	11.8	972	8713	0 falso
1387.685	116.62	6.9	481	7915	0 falso
1439.701	5184.73	267.9	8782	8220	9 falso
1580.825	3431.19	158.5	4188	8594	6 falso
1708.880	59175.32	1567.5	70011	7075	100 falso
1857.925	34485.73	1124.9	175760	7911	58 falso
1879.940	1391.59	52.3	42247	8018	2 falso
2109.038	2378.00	188.9	15758	8116	4 falso
2378.190	4761.10	304.0	21666	8648	8 falso
2394.203	413.96	27.5	1795	8727	1 falso
2578.196	2468.96	259.9	24702	9022	4 falso
2962.195	398.24	50.2	5326	10089	1 falso
3334.297	420.13	19.7	3878	7520	1
3350.182	16148.92	682.6	88209	11330	27
3432.252	15153.99	697.1	157509	9259	26

Figura 10 (cont.)

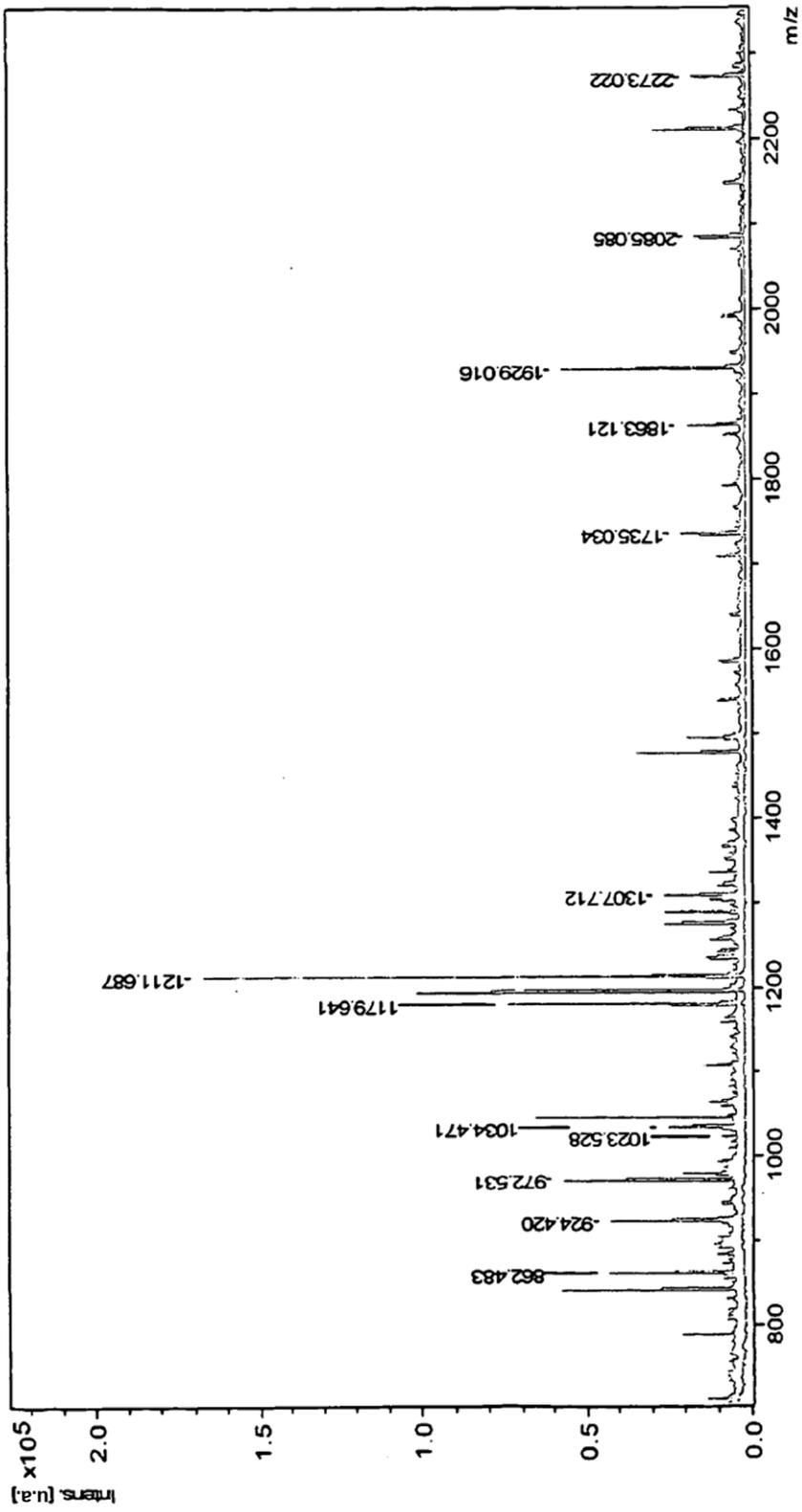


Figura 11

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
862.483	37013.86	64.0	92701	6031	9148	
924.420	36333.07	58.7	20933	5544	10604	
972.531	52266.76	96.9	9768	6167	15355	
978.504	6628.69	12.2	800	7272	1642	
980.487	14742.00	27.5	1360	6022	4247	
1023.528	4602.27	8.7	821	7687	1200	
1034.471	18697.57	35.5	8148	5869	6394	
1179.641	68530.44	120.7	84907	5775	30849	
1194.661	99044.85	165.2	19841	5448	47435	
1211.687	188506.73	311.5	19979	4558	108864	
1273.623	21721.81	41.0	30075	5640	10498	
1287.809	21043.75	41.1	13035	5582	10457	
1307.712	22598.79	46.1	3786	5913	11349	
1334.761	7556.95	16.4	1401	5506	3976	
1735.034	15700.77	44.7	23893	6097	14170	
1863.121	14092.06	41.6	21307	6191	14284	
1929.016	49132.04	148.2	86979	5252	57140	
2085.085	11189.94	41.3	10008	5535	14233	
2273.022	12420.22	51.2	2572	5085	18624	

Figura 11 (cont.)

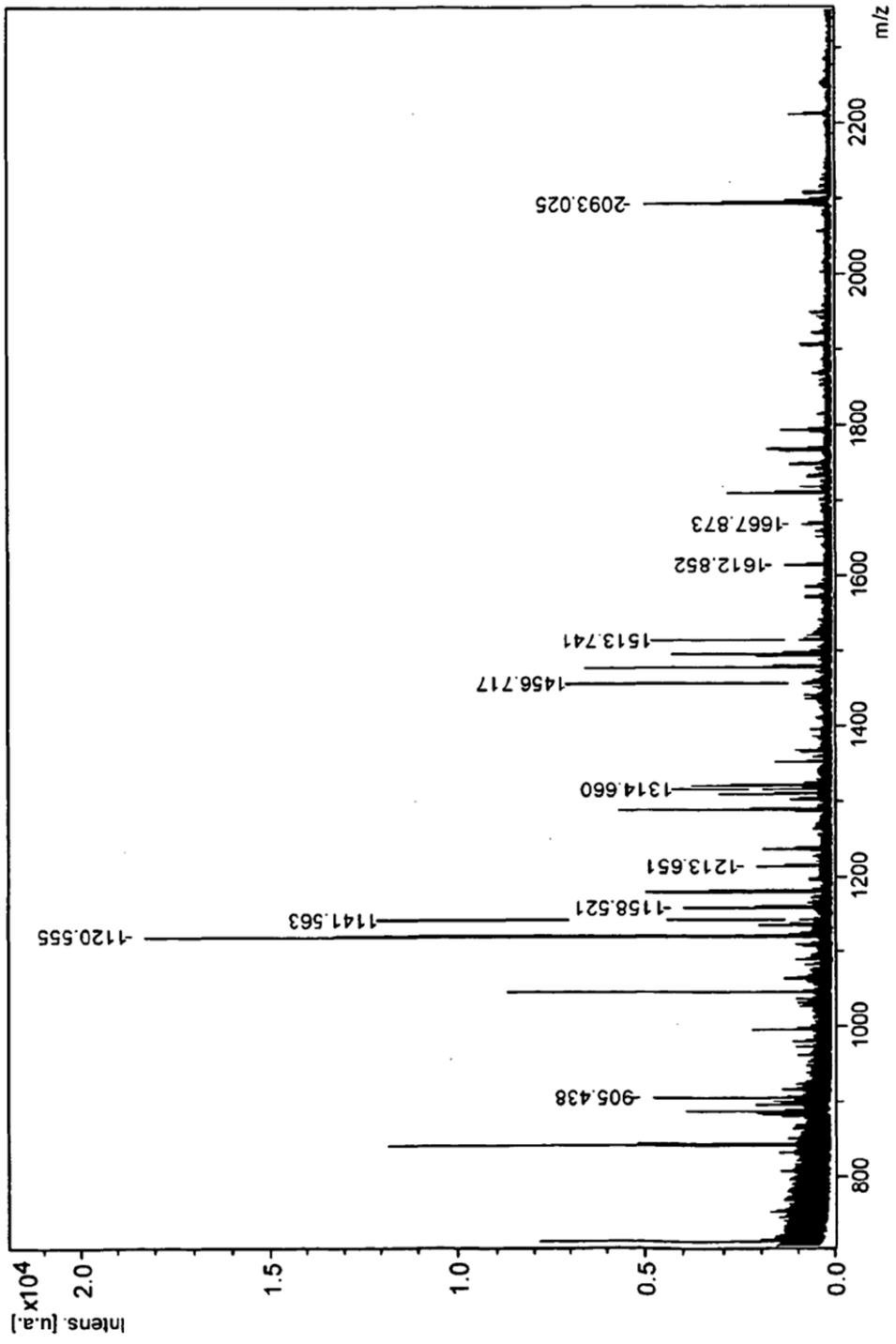


Figura 12

m/z	Intens.	SN	Fac. Calidad	Res.	Intens Rel.	Pico fondo
905.438	4254.56	36.6	5532	4807	23	falso
1120.555	18222.36	197.9	199970	4898	100	falso
1134.567	1785.27	19.8	982	5047	10	falso
1141.563	543.92	6.1	672	5510	3	falso
1158.521	3326.14	38.5	7074	4977	18	falso
1213.651	1636.78	20.5	2099	4947	9	falso
1314.660	1570.05	19.7	4637	5200	9	falso
1350.711	1376.07	18.4	6893	5294	8	falso
1456.717	642.69	8.5	742	5587	4	falso
1497.738	361.07	4.9	606	5655	2	
1513.741	695.87	9.6	4456	5956	4	falso
1612.852	1029.16	15.6	3514	5168	6	falso
1667.873	574.31	8.8	2134	5446	3	falso
2093.025	4041.61	78.8	9172	5705	22	falso

Figura 12 (cont.)

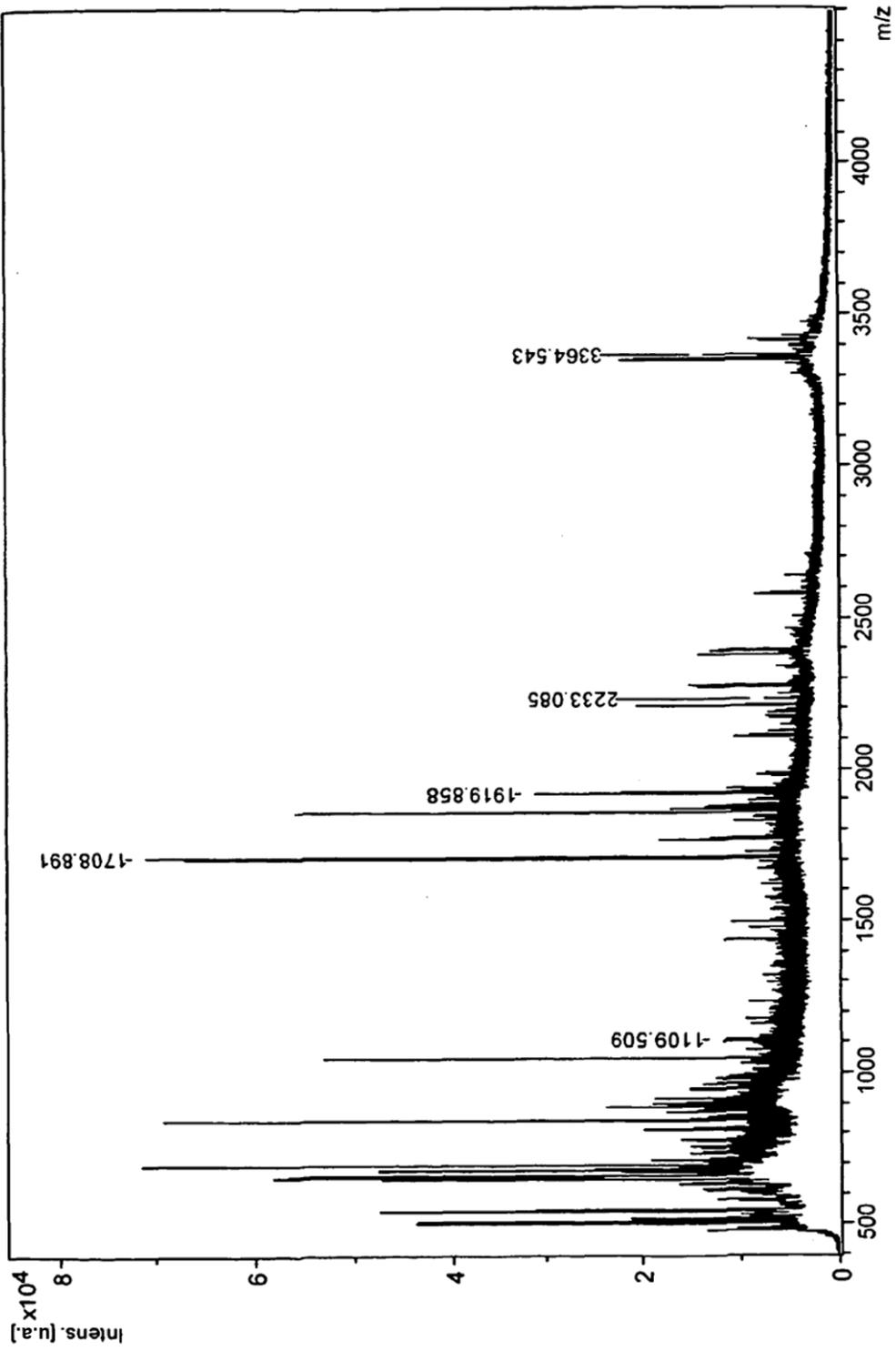


Figura 13

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
1109.509	4058.30	7.3		732	5586	1595
1708.891	66417.85	130.8		127846	4346	76641
1919.858	20114.79	46.0		6491	4142	34166
2233.085	2723.30	8.9		1685	4089	5509
3364.543	4978.63	31.6		4832	3879	18289

Figura 13 (cont.)

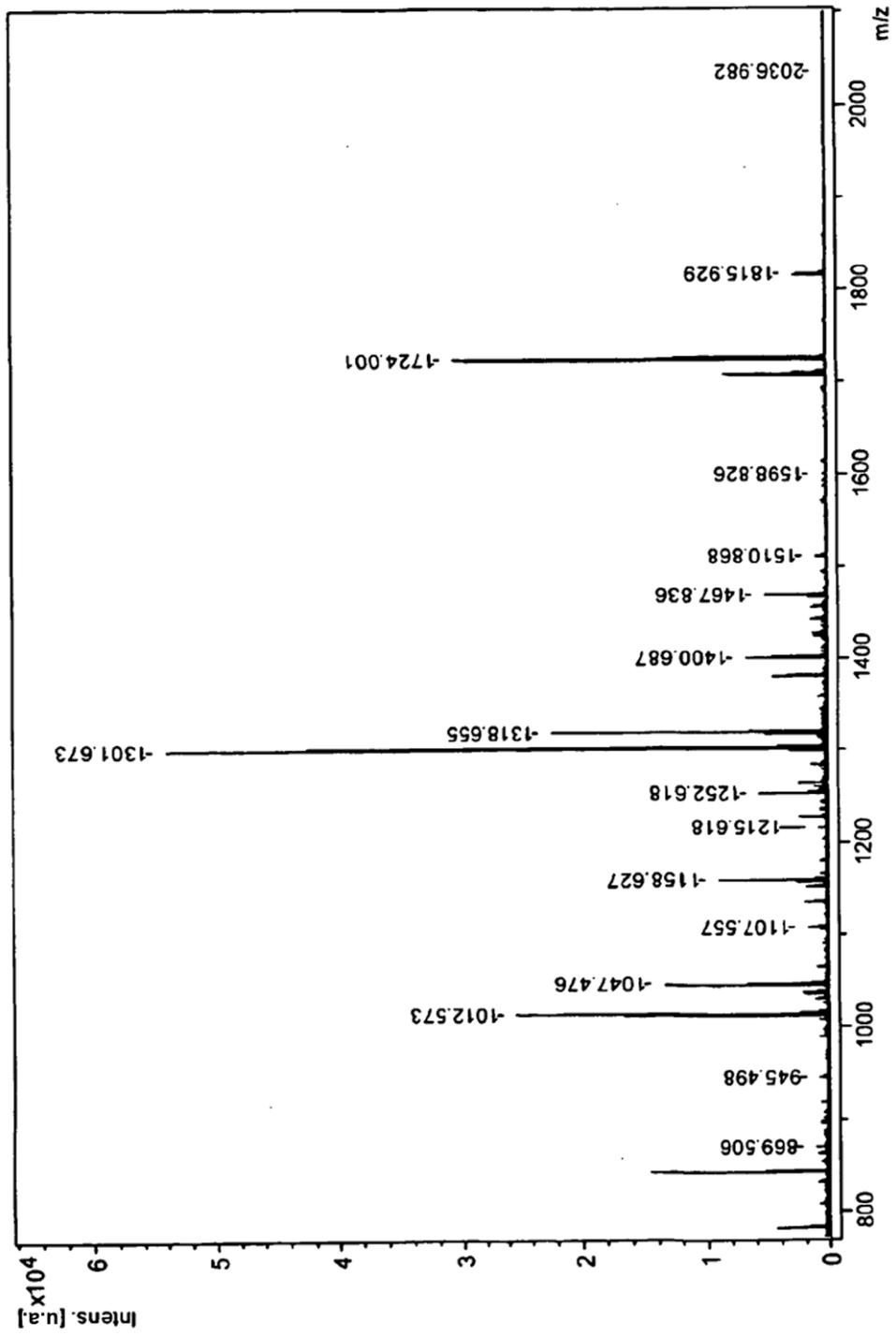


Figura 14

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad Res.	Intens Rel.	Pico fondo
869.506	851.82	14.6	1482	7123	2	falso
945.498	601.52	11.5	1654	6849	1	falso
1008.545	578.60	9.9	883	7082	1	falso
1012.573	24426.15	411.2	34740	6272	44	falso
1016.533	515.34	8.6	721	6982	1	falso
1031.514	569.92	9.0	673	6759	1	falso
1047.476	2083.09	31.3	871	6003	4	falso
1107.557	1214.70	22.1	8356	6715	2	falso
1135.598	1615.04	31.0	5311	7309	3	falso
1152.624	1651.05	31.8	16101	6809	3	falso
1158.627	6793.60	129.5	8430	6651	12	falso
1165.605	529.02	10.2	2680	6675	1	falso
1215.618	705.96	12.0	1136	7863	1	falso
1226.565	2017.29	30.4	5220	7336	4	falso
1252.618	5479.83	66.6	43629	7422	10	falso
1257.661	612.64	7.2	1116	6218	1	falso
1283.598	1097.81	10.8	2115	7042	2	falso
1301.673	55304.72	585.7	39542	6249	100	falso
1318.655	21515.16	250.9	105591	6968	39	falso
1380.736	4249.83	76.3	23560	7778	8	falso
1400.687	6179.62	113.8	37965	7559	11	falso
1411.730	373.77	7.0	1361	7460	1	falso
1424.696	1023.12	19.5	1698	6834	2	falso
1427.702	1021.63	19.6	10318	7696	2	falso
1443.685	1037.56	20.3	11425	8008	2	falso
1455.717	1097.06	21.5	2574	7188	2	falso
1467.836	4542.23	92.5	10762	7630	8	falso
1510.868	841.60	20.2	7750	7802	2	falso
1585.848	246.62	7.5	937	7770	0	falso
1598.826	268.10	8.2	1012	7718	0	falso
1612.811	236.65	7.3	858	8766	0	falso
1724.001	29190.49	733.0	23226	7148	53	falso

Figura 14 (cont.)

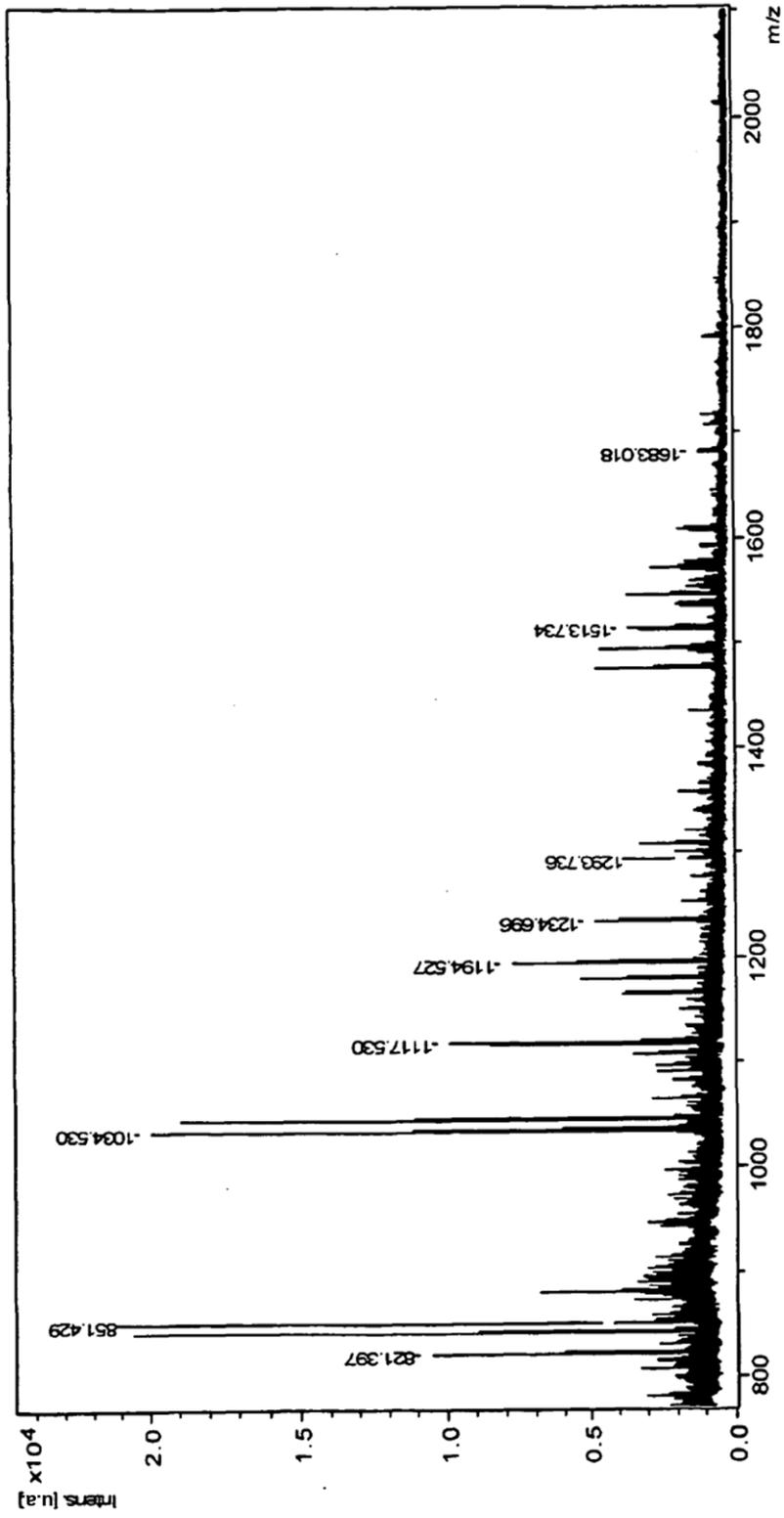


Figura 15

m/z	Intens.	SN	Fac.	Calidad	Res.	Área
821.397	8507.92	41.8	4739	5102	2396	
851.429	2794.41	13.0	734	6201	680	
1034.530	18512.78	107.8	43364	5274	7105	
1037.548	2010.89	11.7	1671	4506	814	
1117.530	7161.75	44.6	7647	5154	3270	
1164.641	3307.95	21.6	1074	5086	1491	
1179.617	4271.74	28.5	6813	4751	2161	
1194.527	6734.33	45.5	87890	4723	3541	
1234.696	4047.51	29.2	5408	4998	2195	
1293.736	1566.00	9.2	71724	3938	655	
1513.734	3160.33	27.0	1783	5081	2169	
1545.842	2760.39	23.0	2577	5561	1926	
1683.018	715.27	8.0	936	4447	721	

Figura 15 (cont.)

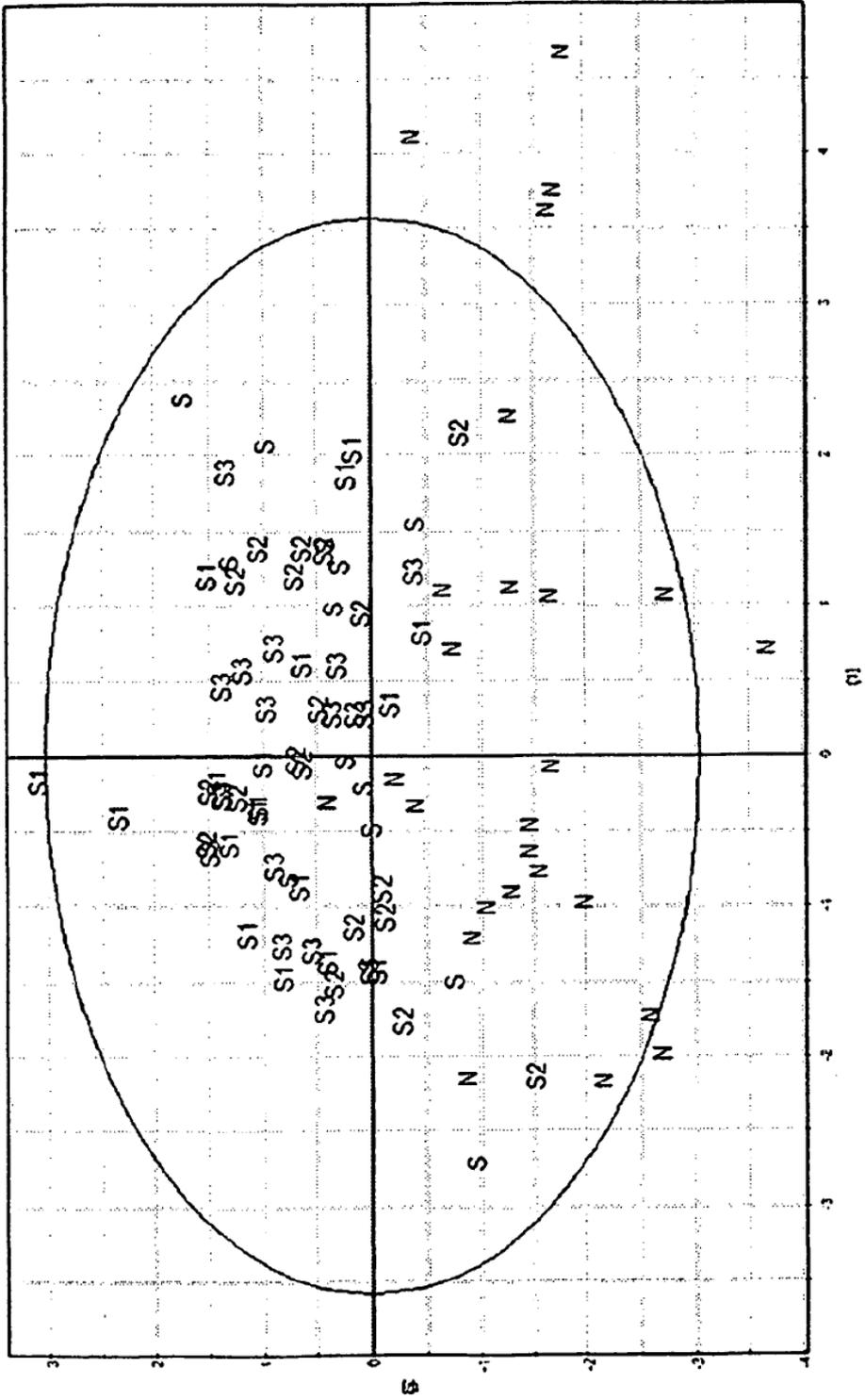


Figura 16

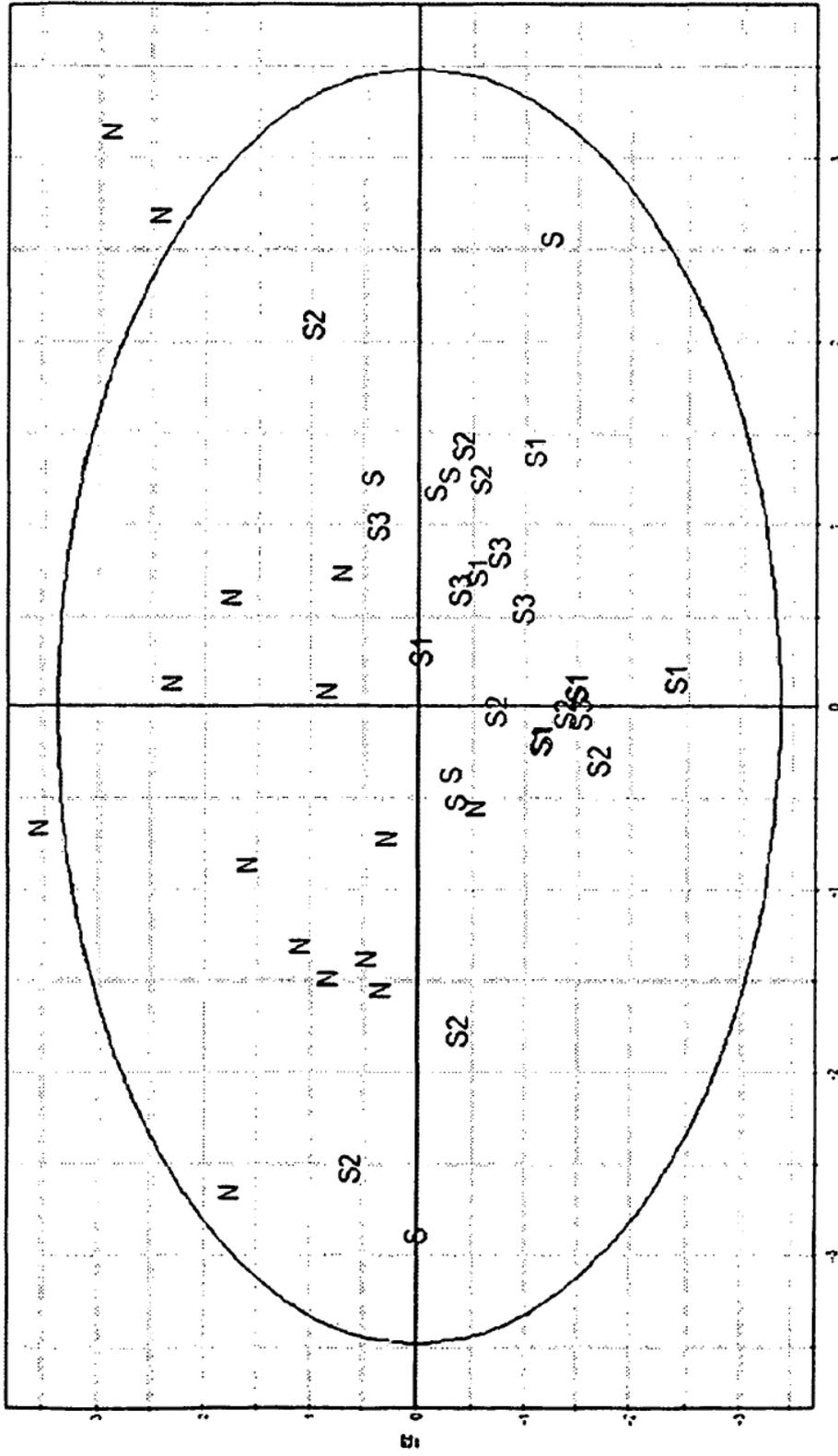


Figura 18