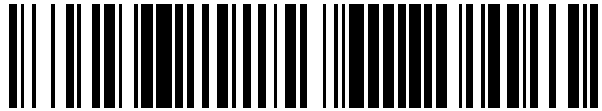


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 757**

51 Int. Cl.:

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2003 E 03743713 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1487395**

54 Título: **Métodos de diagnóstico de la fibrosis hepática**

30 Prioridad:

28.02.2002 US 87188

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

26.08.2013

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey , CH**

72 Inventor/es:

**ROSE, STEVEN, L.;
OH, ESTHER, H. y
WALSH, MICHAEL, J.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 420 757 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

Métodos de diagnóstico de la fibrosis hepática

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere de manera general a los campos de la hepatología y la fibrosis y, más concretamente, a un panel de marcadores serológicos que conjuntamente son diagnósticos de la fibrosis hepática.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 La fibrosis progresiva del hígado, riñones, pulmones y otros órganos frecuentemente resulta en el fallo orgánico, que conduce al trasplante de órgano o a la muerte y afecta a millones de personas en los Estados Unidos y en todo el mundo. La fibrosis hepática, por ejemplo, es la causa gastrointestinal no maligna más importante de muerte en los Estados Unidos, y la progresión de la fibrosis es el determinante principal de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad hepática crónica. Además, el proceso de la fibrosis es común a enfermedades hepáticas de muchas etiologías, incluyendo la hepatitis B y C vírica crónica, enfermedades hepáticas autoinmunitarias tales como la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad hepática grasa, la cirrosis biliar primaria y la enfermedad hepática inducida por medicamentos. La fibrosis observada en estos trastornos resulta de insultos crónicos al hígado, tales como la infección vírica, el alcohol o fármacos.

25 La hepatitis C, por ejemplo, es una de las causas principales de enfermedad hepática crónica en los Estados Unidos, en donde se estima que 3,9 millones de personas se encuentran infectadas crónicamente por virus de la hepatitis C (VHC) y aparecen aproximadamente 30.000 nuevos casos de VHC aguda cada año (Alter, Semin. Liver Dis. 15:5-14, 1995). La prevalencia de la hepatitis C se estima en 1,8% en los Estados Unidos, con hasta 10.000 muertes al año, resultando probablemente de la infección crónica de hepatitis C (Alter, *supra*, 1995).

30 Aunque la fibrosis hepática es un proceso reversible que resulta en la acumulación de matriz extracelular, la cirrosis hepática es un proceso irreversible caracterizado por bandas gruesas de matriz que circundan por completo el parénquima formando nódulos. Si no se trata, la fibrosis del hígado conduce a cirrosis y finalmente a enfermedad hepática de estadio terminal o a cáncer. La cirrosis del hígado es una condición común que con frecuencia no se llega a detectar. Por ejemplo, en una muestra de gran tamaño de la población danesa general, la prevalencia de cirrosis hepática era de 4,5%, de entre los que un tercio no habían sido diagnosticados en el momento de la muerte (Graudal, J. Intern. Med. 230:165-171, 1991).

40 El diagnóstico oportuno y exacto de la fibrosis hepática resulta importante para el tratamiento médico eficaz. A título de ejemplo, los pacientes con hepatitis C y cirrosis es menos probable que respondan al tratamiento con interferón- α que los pacientes con una enfermedad menos avanzada (Davis, Hepatology 26 (supl. 1):122-127S). De manera similar, los tratamientos para la infección crónica por VHC pueden estar contraindicados en pacientes con enfermedad histológicamente avanzada y descompensada (NIH Consensus Development Conference Panel Statement, Hepatology 26(supl. 1):25-105S, 1997). La importancia del diagnóstico precoz queda adicionalmente enfatizada por complicaciones tempranas graves tales como la ruptura de varices asociadas a la cirrosis; estas complicaciones pueden evitarse mediante una detección precoz de la cirrosis (Calés y Pasqual, Gastroenterol. Clin. Biol. 12:245-254, 1988).

50 El diagnóstico de la presencia o severidad de la enfermedad hepática fibrótica resulta difícil, siendo la biopsia hepática el método actualmente más fiable del que se dispone. Desafortunadamente, la biopsia hepática presenta varias limitaciones: dolor en aproximadamente 30% de los pacientes; riesgo de complicaciones severas, tales como hemorragias o infección; una tasa de muerte de 3 en 10.000, y el coste de la hospitalización (Nord, Gastrointest. Endosc. 28:102-104, 1982; Cadranet *et al.*, Hepatology 32:47-481, 2000, y Poynard *et al.*, Can. J. Gastroenterol. 14:543-548, 2000). Además, algunas enfermedades de progresión lenta tales como la hepatitis C requieren biopsias repetidas para una evaluación continua de la progresión de la enfermedad, incrementando de esta manera los riesgos y costes del procedimiento. Finalmente, la biopsia puede no detectar la enfermedad debido a la distribución heterogénea de los cambios patológicos en el hígado; por lo tanto, no resulta inesperado que se observen falsos negativos en un porcentaje significativo de casos biopsiados (Nord, *supra*, 1982).

60 Durante años se han buscado marcadores bioquímicos o serológicos que reflejen los procesos fibróticos de la enfermedad hepática y que puedan servir como sustituto de la biopsia hepática. Sin embargo, el rendimiento de cualquier marcador por sí solo no ha sido suficientemente bueno para sustituir el procedimiento de la biopsia en la detección o estadificación de la fibrosis. De esta manera, existe una necesidad de un método no invasivo de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática. La presente invención satisface dicha necesidad al

proporcionar un método conveniente y fiable para la detección de fibrosis hepática que resulta adecuado para los ensayos en serie. Se proporcionan asimismo ventajas relacionadas.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la detección de la macroglobulina- $\alpha 2$ (MG- $\alpha 2$) en una muestra del individuo; la detección de ácido hialurónico (AH) en una muestra procedente del individuo; la detección de inhibidor de metaloproteinasa-1 en tejidos (TIMP-1) en una muestra del individuo, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la presencia o nivel de MG- $\alpha 2$, AH y TIMP-1. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar una fibrosis hepática leve o la inexistencia de la misma (F0-F1), de la fibrosis hepática moderada a severa (F2-F4).

15 Los métodos de la invención para el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática pueden resultar útiles en una diversidad de poblaciones de pacientes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, aquéllas con hepatitis vírica, enfermedades hepáticas autoinmunitarias tales como la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad hepática grasa y la enfermedad hepática inducida por medicamentos. En una realización, se utiliza un método de la invención para diagnosticar la presencia o la severidad de la fibrosis hepática en un individuo infectado por virus de la hepatitis C.

20 Puede resultar útil una diversidad de medios para detectar $\alpha 2$ -MG, AH y TIMP-1 en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de proteína MG- $\alpha 2$ en una muestra del individuo que debe diagnosticarse, utilizando, por ejemplo, uno o más de los agentes de unión específicos de MG- $\alpha 2$, tales como anticuerpos anti-MG- $\alpha 2$. En otra realización, se pone en práctica un método de la invención mediante la determinación del nivel de actividad de MG- $\alpha 2$ en una muestra del individuo.

25 También puede utilizarse una diversidad de medios en un método de la invención con el fin de detectar ácido hialurónico en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de AH en una muestra, por ejemplo utilizando uno o más agentes de unión específicos de AH, tales como proteínas de unión a AH (PUAH) o anticuerpos anti-AH.

30 De manera similar, también puede utilizarse una diversidad de medios en un método de la invención con el fin de detectar TIMP-1 en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de proteína TIMP-1 en una muestra del individuo que debe diagnosticarse. El nivel de proteína TIMP-1 puede determinarse, por ejemplo, utilizando uno o más agentes específicos de TIMP-1, tales como anticuerpos anti-TIMP-1. En otra realización, la invención se pone en práctica mediante el ensayo de la actividad de TIMP-1 en una muestra del individuo que debe diagnosticarse.

35 La invención proporciona, por ejemplo, un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la determinación del nivel de proteína MG- $\alpha 2$ en una muestra del individuo; la determinación del nivel de AH en una muestra del individuo, y la determinación del nivel de proteína TIMP-1 en una muestra del individuo y el diagnóstico de la presencia o severidad de fibrosis hepática en el individuo basándose en los niveles de proteína MG- $\alpha 2$, AH y proteína TIMP-1. Si se desea, puede determinarse cada uno de los niveles de proteína MG- $\alpha 2$, AH y proteína TIMP-1 utilizando un ensayo ligado a enzima.

40 Puede resultar útil una diversidad de muestras en la práctica de los métodos de la invención, incluyendo, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático. En una realización, se obtiene una sola muestra del individuo que debe diagnosticarse. Dicha muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de suero. Dicha muestra también puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido, por ejemplo, una muestra de biopsia hepática.

45 La presente invención proporciona además un método para diferenciar en un individuo una fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa. El método incluye las etapas de poner en contacto una dilución apropiada de una muestra del individuo con anticuerpo anti-MG- $\alpha 2$ bajo condiciones adecuadas para formar un primer complejo de MG- $\alpha 2$ y anticuerpo anti-MG- $\alpha 2$, el lavado del primer complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de primer complejo que contiene MG- $\alpha 2$, el contacto de una dilución apropiada de una muestra del individuo con una proteína de unión a AH bajo condiciones adecuadas para formar un segundo complejo de AH y proteína de unión a AH, el lavado del segundo complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de segundo complejo que contiene AH, el contacto de una dilución apropiada de una muestra del individuo con anticuerpo anti-TIMP-1 bajo condiciones adecuadas para formar un tercer complejo de TIMP-1 y anticuerpo anti-TIMP-1, el lavado del tercer complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de tercer complejo que contiene TIMP-1, y la diferenciación de la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en el individuo basándose en las cantidades de complejos que contienen MG- $\alpha 2$, AH o TIMP-1.

Los métodos de la invención pueden ponerse en práctica mediante la detección de los tres marcadores MG- α 2, AH y TIMP-1 sin detectar marcadores serológicos adicionales o pueden combinarse con un método de detección de uno o más marcadores adicionales. De esta manera, en una realización, la invención se pone en práctica mediante la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1 y también la detección de por lo menos uno de los marcadores de fibrosis siguientes: propéptido procógeno III N-terminal (PIIINP), laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, ApoA2 ó ApoB. En una realización adicional, la presencia o severidad de la fibrosis hepática se diagnostica mediante la detección de MG- α 2, AH, TIMP-1 y YKL-40 en una muestra de un individuo.

La presente invención proporciona además un método de seguimiento de la eficacia de la terapia antifibrótica en un paciente mediante la detección de macroglobulina- α 2 en una muestra de un paciente en el que se ha administrado una terapia antifibrótica, la detección de ácido hialurónico (AH) en una muestra del paciente, la detección de inhibidor de tejidos de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) en una muestra del paciente, y la determinación de la presencia o severidad de fibrosis hepática en el paciente basada en la presencia o nivel de MG- α 2, AH y TIMP-1, realizando de esta manera el seguimiento de la eficacia de la terapia antifibrótica. Dicho método puede incluir además, si se desea, comparar la presencia o severidad de la fibrosis hepática determinada en la etapa (d) con la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el paciente con mayor antelación. Los métodos de la invención pueden utilizarse para realizar un seguimiento, por ejemplo, de la progresión o regresión de la fibrosis con el tiempo en un paciente tratado con una o más terapias antifibróticas, o para comparar, por ejemplo, las eficacias de dos o más terapias antifibróticas.

En una realización, se detectan como máximo tres marcadores de fibrosis. En otra realización, el método incluye la etapa de detectar en una muestra del paciente por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de: PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 ó apoB.

Puede resultar útil una diversidad de medios para detectar MG- α 2, AH y TIMP-1 en un método de la invención. La etapa (a) puede ponerse en práctica, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de proteína MG- α 2 en la muestra. En una realización, el nivel de proteína MG- α 2 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-MG- α 2. La etapa (b) puede ponerse en práctica, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de AH en la muestra. En una realización, el nivel de AH se determina utilizando uno o más proteínas de unión a AH. La etapa (c) puede ponerse en práctica, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de TIMP-1 en dicha muestra. En una realización, el nivel de TIMP-1 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-TIMP-1.

En la presente memoria se proporciona además un método de diferenciación de la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo mediante la determinación del nivel de MG- α 2 en una muestra del individuo; la determinación de un nivel de AH en una muestra del individuo, la determinación de un nivel de TIMP-1 en una muestra del individuo, y el diagnóstico de que el individuo presenta una fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis en el caso de que el nivel de MG- α 2 sea inferior a un valor de corte X1 de MG- α 2, el nivel de AH sea inferior a un valor de corte Y1 de AH o el nivel de TIMP-1 sea inferior a un valor de corte Z1 de TIMP-1, el diagnóstico de que el individuo presenta una fibrosis hepática moderada a severa en el caso de que el nivel de MG- α 2 sea superior a un valor de corte X2 de MG- α 2, el nivel de AH es superior a un valor de corte Y2 de AH y el nivel de TIMP-1 es superior a un valor de corte Z2 de TIMP-1, y el diagnóstico de que los restantes individuos presentan un estatus indeterminado.

Los métodos de la invención basados en valores de corte dobles para los niveles de los marcadores MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden resultar útiles para diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en una diversidad de poblaciones de pacientes. Los métodos de la invención pueden resultar útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de que un individuo presenta una enfermedad hepática, tal como la hepatitis vírica, una enfermedad hepática autoinmunitaria tal como la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad hepática grasa o una enfermedad hepática inducida por medicamentos. En una realización, los métodos de la invención se utilizan para diferenciar una fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo infectado por el virus de la hepatitis C. Entre las muestras que resultan útiles en los métodos de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático. En una realización, se pone en práctica un método de la invención mediante la determinación del nivel de MG- α 2, el nivel de AH y el nivel de TIMP-1 en una o más muestras de suero del individuo que debe diagnosticarse.

De esta manera, la presente invención proporciona, por ejemplo, un método para diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo en el que la diferenciación se basa en un valor de corte X1 de entre 1,8 y 2,2 mg/ml, un valor de corte Y1 de entre 31 y 39 ng/ml, un valor de corte Z1 de entre 900 y 1.100 ng/ml, un valor de corte X2 de entre 1,8 y 2,2 mg/ml, un valor de corte Y2 de entre 54 y 66 ng/ml y un valor de corte Z2 de entre 1.415 y 1.735 ng/ml. En una realización particular, la diferenciación se basa en

un valor de corte X1 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y1 de 35 ng/ml, un valor de corte Z1 de 1.000 ng/ml, un valor de corte X2 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y2 de 60 ng/ml y un valor de corte Z2 de 1.575 ng/ml. En otra realización, la diferenciación se basa en un valor de corte X1 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y1 de 37 ng/ml, un valor de corte Z1 de 1.100 ng/ml, un valor de corte X2 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y2 de 60 ng/ml y un valor de corte Z2 de 1.575 ng/ml. En una realización adicional, se seleccionan X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2, de manera que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 30%, se diagnostica que por lo menos 65% de los individuos en la población presenta fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis hepática o fibrosis moderada/severa con una precisión de por lo menos 90%. En otra realización, se seleccionan X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2, de manera que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 30%, se diagnostica que por lo menos 65% de los individuos en dicha población presenta fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis hepática o fibrosis moderada/severa con un valor predictivo positivo de por lo menos 90% y un valor predictivo negativo de por lo menos 90%. En todavía una realización adicional, se seleccionan X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2, de manera que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 10%, se diagnostica que por lo menos 70% de los individuos en la población presenta fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis hepática o fibrosis moderada/severa con una precisión de por lo menos 90%.

También se da a conocer un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con un valor de corte X1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; mediante comparación de un nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con un valor de corte Y1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que, en una población con una prevalencia de hasta 40% de fibrosis, por lo menos 65% de los individuos en la población son diagnosticados con una precisión de por lo menos 90%.

El método puede incluir, si se desea, comparar un nivel de un tercer marcador fibrótico Z en el individuo con un valor de corte Z1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z. El primer marcador fibrótico es MG- α 2, el segundo marcador fibrótico es AH y el tercer marcador fibrótico es TIMP-1.

Los niveles de por lo menos estos tres marcadores fibróticos se comparan y, en una realización adicional, se comparan los niveles de exactamente tres marcadores fibróticos. En realizaciones adicionales, se comparan los niveles de por lo menos cuatro o por lo menos cinco marcadores fibróticos. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar la fibrosis leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa.

En una realización específica, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 65% de los individuos en una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 30% con una precisión de por lo menos 93%. En una realización adicional, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 70% de los individuos en una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 20% con una precisión de por lo menos 94%. En todavía una realización adicional, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 70% de los individuos en una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 10% con una precisión de por lo menos 96%.

La presente invención proporciona además un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con un valor de corte X1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; la comparación de un nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con un valor de corte Y1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que los valores de corte X1 e Y1 se optimizan individualmente para proporcionar una característica de rendimiento deseada, en la que el primer marcador fibrótico es MG- α 2, el segundo marcador fibrótico es AH y el tercer marcador fibrótico es TIMP-1. El método de la invención

incluye las etapas de comparar el nivel de un tercer marcador fibrótico Z en el individuo con un valor de corte Z1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z, en los que los valores de corte X1, Y1 y Z1 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada, en la que se comparan los niveles de MG- α 2, AH y TIMP-1. En otra realización, se optimizan los valores de corte utilizando el análisis del diseño experimental (ADE). En realizaciones adicionales, se comparan los niveles de exactamente tres, por lo menos tres, por lo menos cuatro o por lo menos cinco marcadores fibróticos. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar la fibrosis leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa.

La invención proporciona además un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con dos valores de corte X1 y X2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; la comparación del nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con dos valores de corte Y1 e Y2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que, en la que los valores de corte X1, Y1, X2 e Y2 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada. Un método de la invención incluye además las etapas de comparar un nivel del tercer marcador fibrótico Z en el individuo con dos valores de corte Z1 y Z2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z, en el que los valores de corte X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada. Los valores de corte pueden optimizarse convenientemente, por ejemplo utilizando el análisis ADE.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID nº 1, y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 2) para la macroglobulina- α 2 humana madura, disponible de GenBank, número de acceso M36501.

La figura 2 muestra la secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID nº 3, y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 4) para el inhibidor tisular humano de metaloproteinasa-1 (TIMP-1), disponible de GenBank, nº de acceso NM_003254.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Tal como se da a conocer en la presente memoria, los niveles séricos de varios marcadores bioquímicos se analizan en una población de pacientes con hepatitis C confirmada y que presentan un estadio Metavir (puntuación de fibrosis) conocida de F0 a F4, en la que F0 representa una fibrosis muy leve o ausente, y F1, F2 y F3 representan estadios intermedios de fibrosis, y F4 representa fibrosis severa (Knodel *et al.*, Hepatology 1:431-435, 1981). Ver las Tablas 2 y 3. Mediante la utilización del análisis del diseño de experimentos (ADE) para la variación simultánea de múltiples valores de corte, se identificó un panel de cuatro marcadores constituido de ácido hialurónico (AH), PIIINP, colágeno de tipo IV y macroglobulina- α 2 (MG- α 2) que podía diferenciar la fibrosis F0-F1 (ausente o leve) de la fibrosis F2-F4 (moderada a severa) con una precisión de aproximadamente 77% en una población de pacientes con una prevalencia de fibrosis del 60%.

Tal como se da a conocer en mayor detalle en la presente memoria, en el Ejemplo I, dos paneles de tres marcadores, MG- α 2/AH/TIMP-1 y MG- α 2/AH/YKL-40 también diferenciaron bien la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4 al optimizar los valores de corte utilizando el análisis ADE. En particular, cada uno de los paneles MG- α 2/AH/TIMP1 y MG- α 2/AH/YKL-40 presentó un mejor rendimiento que el panel de cuatro marcadores y fueron capaces de diferenciar la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4 con una precisión de aproximadamente 80% en la población de estudio. Tal como puede observarse en la Tabla 6, línea 15, por ejemplo, el panel MG- α 2/AH/TIMP-1 presentó una sensibilidad de 83,48% y una especificidad de 75,95% en la población de estudio, que presentaba una prevalencia de fibrosis de 60%. Estos resultados demuestran que el panel de tres marcadores MG- α 2/AH/TIMP-1 puede resultar útil para diferenciar la fibrosis leve o ausente de la fibrosis moderada a severa.

Basándose en estos resultados, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la detección de MG- α 2 en una muestra del individuo, la detección de AH en una muestra del individuo, la detección de TIMP-1 en una muestra del individuo, y el diagnóstico de la presencia o severidad de fibrosis hepática en el individuo basado en la presencia o nivel de MG- α 2, AH y TIMP-1. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar una fibrosis hepática leve o la inexistencia de la misma (F0-F1), de la fibrosis hepática moderada a severa (F2-F4).

55 Trastornos fibróticos hepáticos y otros trastornos fibróticos

Los métodos de la invención pueden resultar útiles para diagnosticar la presencia o severidad de la fibrosis hepática en una diversidad de individuos, incluyendo los que corren riesgo de sufrir o manifiestan uno o más síntomas de un trastorno hepático caracterizado por fibrosis. Los métodos de la invención pueden utilizarse para diagnosticar fibrosis hepática en un individuo que presenta, por ejemplo, hepatitis vírica, tal como virus de la hepatitis A, B o C, un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como VIH-1, hepatitis persistente crónica o hepatitis activa crónica, enfermedad hepática autoinmunitaria, tal como hepatitis autoinmunitaria, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática grasa, enfermedad hepática no alcohólica, incluyendo la enfermedad hepática grasa no alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, atresia

biliar, enfermedad hepática resultante de tratamiento médico (enfermedad hepática inducida por medicamentos) o una enfermedad hepática congénita. Los métodos de la invención pueden resultar extremadamente útiles, por ejemplo para reducir problemas de potencial daño hepático debido al tratamiento de metotrexato. El seguimiento periódico de la fibrosis hepática en individuos tratados con metotrexato u otros fármacos asociados a riesgo de daño hepático puede llevarse a cabo convenientemente utilizando los métodos no invasivos de la invención, sin los riesgos asociados a la biopsia hepática.

En una realización, los métodos de la invención resultan útiles para diferenciar los individuos que presentan una puntuación Metavir de F0 ó F1 de los individuos que presentan una puntuación Metavir de F2, F3 ó F4. La puntuación Metavir es un sistema aceptado de evaluación del grado de los especímenes de biopsia hepática y se describe en Knodell, *supra*, 1981. F0 es equivalente a la ausencia de fibrosis; F1 significa fibrosis portal sin septos. F2 significa fibrosis portal con unos cuantos septos. F3 significa numeros septos sin cirrosis. F4 significa cirrosis.

Se entiende que los métodos diagnósticos de la invención son aplicables a una diversidad de individuos, incluyendo individuos con enfermedad crónica o activa, individuos con uno o más síntomas de enfermedad fibrótica, individuos asintomáticos o sanos e individuos con riesgo de una o más enfermedades fibróticas. Además, resultará evidente para el experto en la materia que los métodos de la invención pueden resultar útiles, por ejemplo, para corroborar un diagnóstico inicial de enfermedad o para determinar la progresión de la fibrosis en un individuo con un diagnóstico definitivo previo de enfermedad fibrótica. Los métodos de la invención pueden utilizarse para realizar un seguimiento del estatus de una enfermedad fibrótica durante un periodo de tiempo y puede utilizarse además, si se desea, para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento terapéutico. Si se desea, los resultados obtenidos de una muestra de un individuo sometido a terapia pueden compararse, por ejemplo, con los resultados de línea base del individuo previamente al tratamiento, con resultados anteriores durante el tratamiento o con un valor histórico o de referencia.

Los métodos de la invención resultan útiles para diagnosticar la severidad de la fibrosis hepática en un individuo. De esta manera, los métodos de la invención pueden resultar útiles para determinar el "estadio" o grado de fibrosis hepática. En una realización, se utiliza un método de la invención para determinar la puntuación Metavir de un individuo, por ejemplo un individuo con hepatitis C vírica. Tal como se ha indicado anteriormente, la puntuación Metavir es un sistema de puntuación de la fibrosis bien establecido que utiliza los valores de F0 (ausencia), F1 (fibrosis portal sin septos), F2 (fibrosis portal con pocos septos), F3 (fibrosis portal con numerosos septos en ausencia de fibrosis) y F4 (cirrosis). En otras realizaciones, se utiliza un método de la invención para determinar la puntuación Knodell (índice de actividad histológica), la puntuación Ishak (índice modificado de actividad histológica) o la clasificación Scheuer de un individuo, por ejemplo un individuo con hepatitis C vírica. En una realización adicional, se utiliza un método de la invención para determinar la severidad de la fibrosis hepática en un individuo con EHNA, por ejemplo mediante la determinación según la propuesta de Brunt (Brunt *et al.*, Am. J. Gastroenterol. 94:2467-2474, 1999). Se entiende que, en casos en los que se determina la severidad de la fibrosis hepática o de otro tipo de fibrosis según un método de la invención, cualquiera de los sistemas de puntuación anteriormente indicados o de otros sistemas aceptados de la técnica o claramente definidos puede resultar útil para informar de resultados que indican la severidad de la fibrosis.

Muestras

Puede resultar útil una diversidad de muestras en la práctica de los métodos de la invención, incluyendo, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático. En una realización, se obtiene una sola muestra del individuo que debe diagnosticarse. Dicha célula puede ser, por ejemplo, una muestra de suero.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a un espécimen biológico que contiene uno o más marcadores fibróticos, tales como MG- α 2, AH o TIMP-1. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra líquida, tal como sangre completa, plasma, saliva, orina, líquido sinovial u otro líquido corporal, o una muestra de tejido, tal como una muestra de pulmón, hígado, riñón, próstata o mama. El experto en la materia entenderá que pueden diluirse las muestras líquidas, si se desea, previamente al análisis.

El experto en la materia entenderá que puede obtenerse una sola muestra del individuo que debe diagnosticarse y que puede subdividirse previamente a la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1. El experto en la materia entenderá además que, si se desea, pueden obtenerse dos o más muestras del individuo que debe diagnosticarse y que las muestras pueden ser del mismo tipo o de un tipo diferente. En una realización, se detecta cada uno de MG- α 2, AH y TIMP-1 en muestras de suero. En otra realización, se obtiene una sola muestra de suero de un individuo y se subdivide previamente a la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1.

Macroglobulina- α 2

Los métodos de la invención se basan, en parte, en la detección de macroglobulina- α 2 en una muestra. La MG- α 2

es un componente conservado altamente abundante del plasma que funciona como una proteína de unión a proteasa de amplio espectro que elimina las proteasas activas de los líquidos tisulares. Al contrario que los inhibidores de sitio activo de proteasa, miembros de la familia de la macroglobulina- α 2, no inactivan la actividad catalítica de sus sustratos proteasa, sino que actúan mediante atrapamiento físico de la proteasa diana dentro de los pliegues del miembro de la familia de MG- α 2. La MG- α 2 misma es cortada por proteasas diana; la reorganización de la molécula de MG- α 2 resulta en el secuestro de la proteasa diana dentro de un bolsillo interno de la molécula de MG- α 2 (Starkey *et al.*, *Biochem. J.*: 131:823-831, 1973). Aunque una proteasa atrapada por MG- α 2 se encuentra estéricamente bloqueada para interactuar con sustratos macromoleculares, tales como proteínas, sigue siendo activa contra sustratos de baja masa molecular, tales como los compuestos amida y éster, los cuales son capaces de difundirse hasta el interior de la jaula MG- α 2 y acceder al sitio enzimático. De esta manera, la actividad de la MG- α 2 se caracteriza, en parte, por la capacidad de inhibir la actividad proteolítica pero no la actividad amidolítica de un sustrato proteasa. La MG- α 2 se caracteriza además por la capacidad de proteger las proteasas atrapadas frente a anticuerpos e inhibidores de sitio activo de alta masa molecular. Por ejemplo, la tripsina unida a la MG- α 2 se encuentra protegida frente a la inhibición por el inhibidor de tripsina de soja (ITS).

En contraste con la limitada especificidad de los inhibidores de sitio activo de proteasa, la MG- α 2 actúa sobre un amplio espectro de proteasas con una especificidad de sustrato y actividad catalítica diversas. Entre dichas proteasas diana se incluyen la tripsina, la subtilisina, la quimotripsina, la plasmina, la elastasa, la termolisina y la papaína. La diversidad de sustratos está determinada, en parte, por la región "cebo" de la MG- α 2, una secuencia altamente flexible y expuesta al solvente de 30 a 40 residuos que contiene por lo menos un sitio sensible al corte por parte de cada una de las clases principales de enzima proteolítico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "macroglobulina α 2" es sinónima de "MG- α 2" y se refiere a una proteína con una homología estructural significativa con la MG- α 2 humana (SEC ID nº 2) y que presenta una actividad inhibidora de proteasa de amplio espectro. La MG- α 2 contiene un único enlace tiol-éster que resulta inactivado por pequeñas aminas primarias tales como la metilamina. De esta manera, la actividad de la MG- α 2 puede caracterizarse, en parte, por la actividad inhibidora de proteasa sensible a metilamina. La MG- α 2 puede distinguirse, si se desea, de otros miembros de la familia de la macroglobulina- α 2, tales como proteínas de unión a proteasa relacionadas y C3, C4 y C5 del sistema del complemento (Sottrup-Jensen, "α2-Macroglobulin and Related Thiol Ester Plasma Proteins", en Putnam (editor), *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, segunda edición, Orlando: Academic Press, páginas 191-291, 1987. Se entiende que un ensayo de detección de MG- α 2 puede ser específico para MG- α 2 ó puede detectar adicionalmente otro u otros miembros de la familia de la macroglobulina- α 2.

Los métodos de la invención se basan, en parte, en la detección de la macroglobulina- α 2 en una muestra. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "detección de MG- α 2" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo o cualitativo para determinar la presencia de MG- α 2. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "determinación del nivel de MG- α 2" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo directo o indirecto de MG- α 2.

De manera similar, la detección de cualquier marcador fibrótico especificado en una muestra se refiere a la determinación de si el marcador se encuentra presente en la muestra, presentando dicho marcador fibrótico una correlación positiva o negativa con la fibrosis hepática o con otros trastorno fibrótico, tales como los indicados anteriormente en la presente memoria. Se entiende que la detección puede referirse al análisis no cuantitativo, por ejemplo la presencia o la ausencia de una característica particular, variable o sustancia bioquímica o sérica.

El diagnóstico se basa en el análisis de la muestra para la presencia o el nivel del marcador fibrótico o de otra característica y la comparación del mismo con un valor de referencia, en el que el valor de referencia sirve para ayudar a diferenciar los individuos con un trastorno fibrótico respecto de otros individuos. En el caso de que el marcador fibrótico sea un marcador bioquímico o sérico, la determinación de un "nivel" en una muestra se refiere a cuantificar el marcador fibrótico mediante la determinación de, por ejemplo, la cantidad relativa o absoluta de ARN, proteína o actividad del marcador fibrótico. De esta manera, determinar un nivel en una muestra comprende, aunque sin limitación, el análisis de los niveles relativos y absolutos de ARN, proteína y actividad, así como otras medidas directas e indirectas del marcador fibrótico tal como se comenta en mayor detalle posteriormente. Se entiende que cualquier ensayo que resulte útil para determinar un "nivel" de un marcador fibrótico también resulta útil para "detectar" el marcador.

Se conoce de la técnica una diversidad de ensayos para detectar MG- α 2 y entre ellos se incluyen ensayos directos e indirectos para ARN de MG- α 2, proteína MG- α 2 y actividad de MG- α 2. La MG- α 2 puede detectarse, o puede determinarse un nivel de MG- α 2, por ejemplo, mediante el análisis de los niveles de ARNm de MG- α 2 utilizando técnicas rutinarias, tales como el análisis de transferencia northern o la PCR-RT, u otros métodos basados en la hibridación con una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a una parte de la secuencia codificante de MG- α 2. Por ejemplo, se describen condiciones y sondas para el análisis de transferencia northern y la hibridación de transferencia en ranura de ARN en muestras humanas en Ortego *et al.*, *Exp. Eye Res.* 65:289-299, 1997, y

Simon *et al.*, Cancer Res. 56:3112-3117, 1996, respectivamente.

La MG- α 2 también puede detectarse, o puede determinarse un nivel de MG- α 2, mediante el ensayo para la proteína MG- α 2 utilizando una diversidad de métodos. Los inmunoensayos, incluyendo los radioinmunoensayos, los inmunoensayos ligados a enzima y los ensayos de sándwich de dos anticuerpos, tales como los descritos en mayor detalle posteriormente, resultan útiles en los métodos de la invención. Por ejemplo, en los ensayos de nefelometría, los complejos de MG- α 2 y anticuerpo anti-MG- α 2 resultan en una dispersión lumínica incrementada que se convierte en una señal de tasa máxima, que es una función de la concentración de MG- α 2 en la muestra. La MG- α 2 también puede detectarse, por ejemplo, mediante inmunonefelometría láser utilizando un analizador nefelómetro Behring (Fink *et al.*, J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem. 27:261-276, 1989) y antisuero de conejo anti-MG- α 2 humano, tal como se describe en Naveau *et al.*, Dig. Diseases Sci. 39:2426-2432, 1994, o mediante la utilización del ensayo de nefelometría disponible comercialmente de Beckman Coulter (Brea, CA, kit nº 449430). Además, los anticuerpos anti-MG- α 2 monoclonales y policlonales que resultan útiles en inmunoensayos pueden obtenerse fácilmente de una diversidad de fuentes. A títulos ejemplos, los anticuerpos purificados por afinidad de cabra anti-MG- α 2 humana y de cabra anti-MG- α 2 marcado con peroxidasa adecuados para inmunoensayos tales como los ensayos ELISA y la transferencia Western se encuentran disponibles de Cedarlane Laboratories Limited (Ontario, Canada; CL20010AP y CL20010APHP) y de Affinity Biologicals Incorporated (Ontario, Canada; GAA2M-AP y GAA2M-APHRP). Los niveles de proteína MG- α 2 también pueden determinarse mediante cuantificación de la cantidad de proteína MG- α 2 purificada. La purificación de la macroglobulina- α 2 puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante HPLC, sola o en combinación con espectrometría de masas, o tal como se describe, por ejemplo, en Hall y Roberts, Biochem. J. 171:27-38, 1978, o en Imber y Pezzo, J. Biol. Chem. 256:8134-8139, 1981. La cuantificación puede determinarse mediante métodos bien conocidos, incluyendo los ensayos de Bradford, la tinción con azul de Coomassie y ensayos para proteína marcada radioactivamente.

Una diversidad de ensayos para la actividad de MG- α 2 también pueden resultar útiles para detectar MG- α 2 ó para determinar el nivel de MG- α 2 en una muestra según un método de la invención. La MG- α 2 puede detectarse, o puede determinarse indirectamente un nivel de MG- α 2, por ejemplo, como función de la inhibición de la actividad de la proteasa diana, sin una inhibición correspondiente de la actividad amidolítica. Tal como se ha comentado anteriormente, las proteasas unidas a MG- α 2 conservan la capacidad de hidrolizar los enlaces amida y éster de sustratos pequeños, aunque los sustratos de masa molecular elevada, tales como proteínas, no pueden ser hidrolizados (ver, por ejemplo, Armstrong *et al.*, Develop. Compar. Immunol. 23:375-390, 1999). A título de ejemplo, la MG- α 2 puede detectarse o puede determinarse el nivel de MG- α 2 mediante el ensayo para la inhibición de la actividad de tripsina, subtilisina, quimotripsina, plasmina, elastasa, termolisina o papaína sin inhibición de la actividad amidolítica. Entre los sustratos convenientes que deben analizarse se incluyen la caseína marcada con ^{14}C y la fibrina- ^{125}I .

La característica de la especificidad amplia de sustrato proteasa distingue la MG- α 2 de los inhibidores de sitios activos de proteasa. Basándose en esta característica, puede detectarse la MG- α 2 ó puede determinarse el nivel de MG- α 2 mediante el ensayo para la inhibición de la actividad de dos o más proteasas con diferentes especificidades de sitio activo. La MG- α 2 puede detectarse o puede determinarse el nivel de MG- α 2 en una muestra, por ejemplo mediante el análisis de la reducción de la actividad de proteasa de dos o más proteasas diana, tales como dos o más de las proteasas siguientes: tripsina, subtilisina, quimotripsina, plasmina, elastasa, termolisina y papaína. Los sustratos de proteasa marcados, tales como caseína- ^{14}C o la fibrina- ^{125}I pueden resultar útiles en dichos métodos (Armstrong *et al.*, *supra*, 1999).

La MG- α 2 también puede detectarse, o puede determinarse el nivel de MG- α 2, basándose en la capacidad de la MG- α 2 de proteger una proteasa unidad frente a un anticuerpo o un inhibidor de elevado peso molecular. Puede añadirse una proteasa diana, tal como tripsina, subtilisina, quimotripsina, plasmina, elastasa, termolisina o papaína, a una muestra de plasma. Tras la eliminación de la proteasa no unida, por ejemplo mediante inmunoprecipitación con anticuerpo anti-proteasa, puede determinarse la cantidad de proteasa unida por la MG- α 2 utilizando un sustrato amida o éster de baja masa molecular. La cantidad de sustrato de baja masa molecular hidrolizado es un indicador de la cantidad de proteasa protegida, unida a MG- α 2, y, por lo tanto, de la concentración de MG- α 2. De manera similar, puede hacerse reaccionar una muestra con una proteasa tal como tripsina y posteriormente con un exceso de inhibidor de proteasa, tal como inhibidor de tripsina de soja, antes del ensayo de la actividad residual de tripsina con un sustrato de baja masa molecular tal como amida BAPpNA (p-nitroanilida de N α -benzoil-DL-arginina (Ganrot, Clin. Chem. Acta 14:493-501, 1966; Armstrong *et al.*, J. Exp. Zool. 236:1-9, 1985)). La tripsina no secuestrada por MG- α 2 resulta inactivada por el inhibidor de tripsina, quedando sólo la tripsina protegida por MG- α 2 con capacidad para la hidrólisis del sustrato. De esta manera, una reacción positiva en un ensayo de inhibidor de tripsina de soja detecta la MG- α 2 y es una medida cuantitativa de la cantidad de MG- α 2 (Armstrong *et al.*, *supra*, 1999). El experto en la materia entenderá que la presencia de inhibidores de proteasa de baja masa molecular capaces de inactivar enzima unido a MG- α 2 pueden afectar a los resultados obtenidos con dicho ensayo. Se entiende además que dichos ensayos y otros ensayos rutinarios para la actividad de MG- α 2, así como de los niveles de ARN o proteína MG- α 2, pueden resultar útiles para detectar MG- α 2 ó para determinar un nivel de MG- α 2 en un método de la invención.

Ácido hialurónico

5 Los métodos de la invención se basan además, en parte, en la detección de ácido hialurónico o en la determinación del nivel de ácido hialurónico en una muestra. El ácido hialurónico, también conocido como hialuronato o hialuronano, es un polisacárido de elevado peso molecular con un esqueleto no ramificado constituido por fracciones alternantes de ácido glucurónico y $\beta(1,3)$ -N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β -1,4. El ácido hialurónico puede presentar una longitud de entre unas cuantas y más de 1.000 unidades diméricas, presentando cada unidad dimérica un peso molecular de aproximadamente 450 D. El ácido hialurónico, el cual es producido principalmente por fibroblastos y otras células especializadas del tejido conectivo, desempeña una función estructural en la matriz del tejido conectivo. Además, el ácido hialurónico se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo y puede encontrarse en forma de molécula libre en, por ejemplo, plasma, líquido sinovial y orina. En el plasma, el ácido hialurónico presenta una semivida relativamente corta.

15 Los niveles séricos de AH pueden encontrarse elevados en enfermedades hepáticas, incluyendo la cirrosis (Bramley *et al.*, J. Hepatol. 13:8-13, 1991; Ueno *et al.*, Gastroenterol. 105:475-481, 1993); Oberti *et al.*, Gastroenterol. 113:1609-1616, 1997, y McHutchison *et al.*, J. Gastroenterol. Hepatol. 15:945-951, 2000). Los niveles séricos de AH también pueden encontrarse elevados durante la inflamación sinovial y la destrucción del cartílago observadas en la artritis reumatoide; se ha observado que dichos niveles se correlacionan con la actividad de la enfermedad y el grado de implicación sinovial (Kontinen *et al.*, Clin. Chimica Acta 193:39-48, 1990; Poole *et al.*, Arthritis Rheum. 37:1030-1038, 1994); Goldberg *et al.*, Arthritis Rheum. 34: 799-807, 1991, y Emlen *et al.*, J. Rheum. 23:974-978, 1996). También pueden encontrarse presentes niveles séricos elevados de AH en, por ejemplo, pacientes con osteoartritis (OA), esclerosis sistémica progresiva (ESP) y lupus eritematoso sistémico (LES).

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ácido hialurónico" es sinónima de "AH" y se refiere a un polímero de dos o más unidades diméricas de fracciones alternantes de ácido glucurónico y $\beta(1,3)$ -N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β -1,4. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "detección de AH" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo o cualitativo para determinar la presencia de AH, y la expresión "determinación del nivel de AH" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo directo o indirecto de AH. En vista de lo anteriormente expuesto, se entiende que la expresión "detección de AH" comprende "determinar el nivel de AH".

35 El AH puede detectarse, o puede determinarse el nivel de AH, utilizando uno de entre una diversidad de ensayos bien conocidos basados en proteínas de unión a AH o anticuerpos anti-AH, o mediante cuantificación del AH purificado. Las proteínas de unión a AH, por ejemplo, pueden resultar útiles para detectar el AH; un ensayo radiométrico de AH basado en proteína de unión a AH marcado con 125 I se encuentra disponible de Pharmacia (Guechot *et al.*, Clin. Chem. 42:558-563, 1996). Otros ensayos comerciales basados en proteínas de unión a AH se encuentran disponibles de, por ejemplo, Corgenix (Westminster, CO, kit nº 029001). Además, el AH puede detectarse, o determinarse el nivel de AH, utilizando hialuronectina, tal como se describe en Maingonnat y Delpech, Ann. Clin. Biochem. 28:305-306, 1991, o utilizando el kit disponible de Nalgenunc International (Rochester, NY; Delpech y Bertrand, Anal. Biochem. 149:555-565, 1985). Entre los ensayos para detectar AH o para determinar un nivel de AH se incluyen una diversidad de ensayos de unión competitiva y no competitiva, por ejemplo ensayo de unión competitiva utilizando proteína de unión a AH marcada con 125 I; ensayos de unión competitiva basados en hialuronectina (HN) marcada con fosfatasa alcalina, y ensayos de unión no competitiva basados en proteoglicano marcado con peroxidasa o proteína de unión a AH marcada con peroxidasa, entre otros (Lindquist *et al.*, Clin. Chem. 38: 127-132 (1992)). Ver también Delpech y Bertrand, *supra*, 1985; Engstrom-Laurent *et al.*, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 45:497-504, 1985; Brandt *et al.*, Acta Otolaryn. 442(supl.):31-35, 1987; Goldberg, Anal. Biochem. 174:448-458, 1988; Chichibu *et al.*, Clin. Chim. Acta 181:317-324, 1989; Li *et al.*, Conn. Tissue Res. 19:243-254, 1989; Poole *et al.*, Arth. Rheum. 33:790-799, 1990; Poole *et al.*, J. Biol. Chem. 260:6020-6025, 1985, y Laurent and Tengblad, Anal. Biochem. 109:386-394, 1980). Los ensayos para detectar AH o para determinar el nivel de AH en una muestra pueden llevarse a cabo utilizando una diversidad de formatos de inmunoensayo, incluyendo los radioinmunoensayos y los inmunoensayos ligados a enzima. El antisuero anti-AH útil en los inmunoensayos puede ser, por ejemplo el antisuero anti-AH de oveja purificado por afinidad disponible de Biotrend (Cologne, Alemania, nº 5029-9990).

55 También puede determinarse el nivel de AH mediante la purificación del AH de una muestra y la cuantificación de la cantidad de polisacárido purificado. Puede utilizarse la cromatografía líquida de alto rendimiento sola o conjuntamente con espectrometría de masas. A título de ejemplo, puede utilizarse la HPLC para determinar los niveles de AH tras la digestión de muestras que contienen un estándar interno con hialuronidasa, la separación con una columna de fase inversa de octadecilsililo y la elución con fosfato de tetrabutilamonio 0,01 M-acetonitrilo (83:17, v/v) a pH 7,35 (Payan *et al.*, J. Chromatogr. 566:9-18, 1991).

Se ha demostrado que los niveles de AH se correlacionan con los niveles de hialuronidasa (Bray *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis. 3:284-288, 1991). De esta manera, el AH puede detectarse, o puede determinarse el nivel de AH,

indirectamente mediante ensayo de la actividad de hialuronidasa. Se conocen de la técnica ensayos de actividad de hialuronidasa, tal como se describe en Bray *et al.*, *supra*, 1991. El experto en la materia entenderá que dichos ensayos y otros ensayos rutinarios para determinar los niveles de hialuronidasa o de AH se encuentran comprendidos en las expresiones "detección de AH" y "determinación del nivel de AH" y pueden resultar útiles en el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática según un método de la invención.

TIMP-1

Los métodos de la invención se basan además en la detección de TIMP-1 en una muestra y, en realizaciones particulares, en la determinación de un nivel de TIMP-1 en una muestra. Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) regulan la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP), los cuales son un grupo importante de enzimas degradativos de la ECM que incluye la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). En el hígado normal, los componentes matriciales, tales como colágenos, fibronectina, laminina, tenascina, undulina y entactina son constantemente remodelados por los enzimas degradativos de la matriz, controlando la deposición de la matriz extracelular. La elevación de los niveles de TIMP resulta en la inhibición de la actividad de MMP y favorece la acumulación de la matriz extracelular. Los TIMP, incluyendo TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, interactúan con las metaloproteinasas de matriz con una estequiometría 1:1 e inhiben la actividad de metaloproteasa mediante unión no covalente reversible. TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 presentan actividades inhibitoras de MMP similares, inhibiendo la actividad proteolítica de la colagenasa, la gelatinasa, la estromelina, la proteoglicanasa y las metaloelastasas, aunque su localización y regulación son diferentes (Cawston *et al.*, "Protein Inhibitors of Metalloproteinases", en: Barrett and Salvesen (editores), Proteinase Inhibitors, Amsterdam, Elsevier, páginas 589 a 610, 1986).

La TIMP-1 humana es una sialoglucoproteína de 184 aminoácidos con un peso molecular de 28,5 kDa (Murphy *et al.*, Biochem. J. 195:167-170, 1981; Dockerty *et al.*, Nature 318:66-69, 1985, y Bodden *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 18943-18952, 1994). La TIMP-1 inhibe todas las metaloproteinasas activas, por ejemplo la colagenasa MMP-1, así como la estromelina y la gelatinasa B (MMP-9). La secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID nº 3, y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 4) de la TIMP-1 humana se muestran en la figura 2.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "inhibidor tisular de la metaloproteinasas-1" es sinónima de "TIMP-1" y se refiere a una proteína con una homología estructural significativa con la TIMP-1 humana (SEC ID nº 4) que inhibe la actividad proteolítica de las metaloproteinasas con una especificidad similar a la TIMP-1 humana. La presencia de TIMP-1 humana puede detectarse convenientemente mediante la presencia de epítomos, los cuales son reactivos con un anticuerpo anti-TIMP-1 específico conocido, tal como 7-6Cl ó 7-23G9.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "detección de TIMP-1" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo o cualitativo para determinar la presencia de TIMP-1, y la expresión "determinación del nivel de TIMP-1" se refiere a cualquier ensayo cuantitativo directo o indirecto de TIMP-1. En vista de lo anteriormente expuesto, se entiende que la expresión "detección de TIMP-1" comprende "determinación del nivel de TIMP-1".

Los ensayos de detección de TIMP-1 y para determinar un nivel de TIMP-1 incluyen ensayos bien conocidos de TIMP-1, ARN, proteínas y actividades enzimáticas. Los métodos para determinar los niveles de ARN de TIMP-1 mediante análisis de transferencia northern o PCR-RT son bien conocidos de la técnica (Yoshijiet *et al.*, Int. J. Cancer 69:131-134, 1996; Janowska-Wieczorek *et al.*, Exp. Hematol. 28:1274-1285, 2000, y Groft *et al.*, Br. J. Cancer 85:55-63, 2001) se describen en mayor detalle posteriormente. La proteína TIMP-1 puede detectarse, o el nivel de proteína TIMP-1 puede determinarse convenientemente, por ejemplo mediante radioinmunoensayo tal como se describe en Brophy *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 167:898-903, 1990, o mediante ensayo sándwich de dos anticuerpos, tal como se describe en Murawaki *et al.*, Clinica Chimica Acta 218:47-58, 1993. Las concentraciones plasmáticas de proteína TIMP-1 pueden someterse a ensayo mediante ELISA con un kit disponible comercialmente de Amersham Pharmacia (ver también el Ejemplo III). Los niveles de proteína TIMP-1 también pueden determinarse mediante cuantificación de la cantidad de proteína TIMP-1 purificada. La purificación de TIMP-1 puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante HPLC, sola o en combinación con espectrometría de masas, o tal como se describe, por ejemplo, en Murphy *et al.*, Biochem. J. 195:167-170, 1978, o en Stricklin y Welgus, J. Biol. Chem. 258:12252-12258, 1983. TIMP-1 también puede detectarse o determinarse un nivel de TIMP-1 mediante el ensayo para la inhibición de la actividad de una o más metaloproteasas, por ejemplo utilizando la zimografía inversa en gelatina, tal como se describe en Kossakowska *et al.*, Amer. J. Pathology 153:1895-1902, 1998. Los ensayos para ARN, proteína o actividad de TIMP-1 se describen en mayor detalle posteriormente, y el experto en la materia entenderá que estos ensayos y otros ensayos rutinarios para detectar TIMP-1 se encuentran comprendidos en los métodos de la invención.

Análisis de inclusión/descarte

Tal como se da a conocer en la presente memoria, pueden utilizarse dos conjuntos de valores de corte para incrementar la precisión de un ensayo basado en el panel de tres marcadores MG- α 2/AH/TIMP-1. Tal como se

indica en el Ejemplo II, un primer conjunto de valores de corte para MG- α 2, AH y TIMP-1 se seleccionó basándose en la optimización para la sensibilidad con el fin de, en primer lugar, descartar la fibrosis, seguido del análisis de la población "positiva" utilizando un segundo conjunto de valores de corte optimizado para especificidad con el fin de determinar la presencia de fibrosis significativa. La Tabla 7 muestra los resultados de la estrategia de doble optimización sobre la población de estudio de 194 pacientes de VHC. Los valores de corte primarios se fijaron en 2,0 mg/ml, 35 ng/ml y 1.000 ng/ml para MG- α 2, AH y TIMP-1, respectivamente, para alcanzar una elevada sensibilidad en el análisis primario. Cualesquiera muestras con los tres niveles, de MG- α 2, de AH y de TIMP-1, superiores a los valores de corte primarios se indicó tentativamente que eran positivos para fibrosis F2-F4 y se evaluaron adicionalmente utilizando un segundo conjunto de valores de corte de 2,0 mg/ml, 60 ng/ml y 1.575 ng/ml para MG- α 2, AH y TIMP-1, respectivamente, los cuales se obtuvieron mediante la optimización para la especificidad.

Mediante la utilización del segundo conjunto de valores de corte optimizados para especificidad elevada, 54 de los 122 pacientes inicialmente designados como positivos para fibrosis F2-F4 se confirmaron como positivos, de los cuales sólo uno era un falso positivo. En resumen, de los 194 pacientes de VHC en la población de estudio, se clasificaron 72 como negativos (que presentaban fibrosis F0-F1) y 54 se clasificaron como positivos (que presentaban fibrosis F2-F4), mientras que 68 muestras presentaron resultados indeterminados y no se clasificaron. Al excluir las muestras indeterminadas, el panel de MG- α 2/AH/TIMP-1 produjo un valor predictivo positivo de aproximadamente 98% y un valor predictivo negativo de aproximadamente 79%. Además, en una población de pacientes más típica que presentaba una prevalencia de fibrosis de 30%, el mismo panel produjo valores predictivos positivos y negativos próximos a 93%. Estos resultados indican que la utilización de niveles de corte primarios y secundarios, en los que se optimiza inicialmente la sensibilidad, seguido de la optimización de la especificidad, puede incrementar la precisión global de un ensayo de tres marcadores, resultando en un ensayo de panel con una precisión de aproximadamente 93% para las muestras no indeterminadas, lo que constituye aproximadamente 70% de las muestras sometidas a ensayo.

De esta manera, la presente invención proporciona un método de diferenciación de la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo mediante la determinación del nivel de MG- α 2 en una muestra del individuo; la determinación de un nivel de AH en una muestra del individuo, la determinación de un nivel de TIMP-1 en una muestra del individuo, y el diagnóstico de que el individuo presenta una fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis en el caso de que el nivel de MG- α 2 sea inferior a un valor de corte X1 de MG- α 2, el nivel de AH sea inferior a un valor de corte Y1 de AH o el nivel de TIMP-1 sea inferior a un valor de corte Z1 de TIMP-1, el diagnóstico de que el individuo presenta una fibrosis hepática moderada a severa en el caso de que el nivel de MG- α 2 sea superior a un valor de corte X2 de MG- α 2, el nivel de AH es superior a un valor de corte Y2 de AH y el nivel de TIMP-1 es superior a un valor de corte Z2 de TIMP-1, y el diagnóstico de que los restantes individuos presentan un estatus indeterminado.

Los métodos de la invención basados en valores de corte dobles para los niveles de los marcadores MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden resultar útiles para diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en una diversidad de poblaciones de pacientes. Dichos métodos pueden resultar útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de que un individuo presenta una enfermedad hepática, tal como la hepatitis vírica, una enfermedad hepática autoinmunitaria tal como la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad hepática grasa o una enfermedad hepática inducida por medicamentos. En una realización, se utiliza un método de la invención para diferenciar una fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo infectado por el virus de la hepatitis C. Entre las muestras que resultan útiles en los métodos de la invención basados en valores de corte dobles se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático. En una realización, se pone en práctica un método de la invención mediante la determinación del nivel de MG- α 2, el nivel de AH y el nivel de TIMP-1 en una o más muestras de suero.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo en el que la diferenciación se basa en un valor de corte X1 de entre 1,8 y 2,2 mg/ml, un valor de corte Y1 de entre 31 y 39 ng/ml, un valor de corte Z1 de entre 900 y 1.100 ng/ml, un valor de corte X2 de entre 1,8 y 2,2 mg/ml, un valor de corte Y2 de entre 54 y 66 ng/ml y un valor de corte Z2 de entre 1.415 y 1.735 ng/ml. En otra realización, la diferenciación se basa en un valor de corte X1 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y1 de 35 ng/ml, un valor de corte Z1 de 1.000 ng/ml, un valor de corte X2 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y2 de 60 ng/ml y un valor de corte Z2 de 1.575 ng/ml. En todavía otra realización, la diferenciación se basa en un valor de corte X1 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y1 de 37 ng/ml, un valor de corte Z1 de 1.100 ng/ml, un valor de corte X2 de 2,0 mg/ml, un valor de corte Y2 de 60 ng/ml y un valor de corte Z2 de 1.575 ng/ml. En una realización adicional, se seleccionan X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2, de manera que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 30%, se diagnostica que por lo menos 65% de los individuos en la población presenta fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis hepática o fibrosis moderada a severa con una precisión de por lo menos 90%. En todavía una realización adicional, se seleccionan X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2, de manera que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 10%, se diagnostica que por lo

menos 70% de los individuos en la población presenta fibrosis hepática leve o no presenta fibrosis hepática o fibrosis moderada a severa con una precisión de por lo menos 90%.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, los métodos de la invención son altamente precisos para determinar la presencia o severidad de la fibrosis en un subgrupo de la población de pacientes entera sometida a ensayo. Por ejemplo, tal como se muestra en la Tabla 7, los métodos de la invención alcanzan una precisión superior al 93% en la determinación del estatus de la fibrosis F0-F1 ó F2-F4 en aproximadamente 70% de una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de 30%. El 30% restante de la población de pacientes se indica que presenta un estatus indeterminado. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "estatus indeterminado" se refiere a que el individuo no puede ser fiablemente diagnosticado con un valor predictivo suficiente.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "X1" o "X2" se refiere a un valor de corte de MG- α 2 respecto al que se compara el nivel de una muestra experimental de MG- α 2. De manera similar, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "Y1" o "Y2" se refiere a un valor de corte de AH respecto al que se compara el nivel de una muestra experimental de AH. El término "Z1" o "Z2", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un valor de corte de TIMP-1 respecto al que se compara el nivel de una muestra experimental de TIMP-1. Los valores de corte X1, Y1 y Z1 se agrupan para determinar la presencia o severidad de la fibrosis en una muestra. Los valores de corte X2, Y2 y Z2 se agrupan para determinar la presencia o severidad de la fibrosis en una muestra. Una muestra que presentase un nivel de MG- α 2 inferior a X1, un nivel de AH inferior a Y1, o un nivel de TIMP-1 inferior a Z1 se clasificaba como presentando una fibrosis F0-F1. Una muestra que presentase un nivel de MG- α 2 superior a X1, un nivel de AH superior a Y1, y un nivel de TIMP-1 superior a Z1 se consideraba posiblemente positivo para fibrosis F2-F4 y que merecía un análisis adicional. Además, una muestra que presentase un nivel de MG- α 2 superior a X2, un nivel de AH superior a Y2, y un nivel de TIMP-1 superior a Z2 se consideraba que presentaba fibrosis F2-F4. Una muestra que presentase un nivel de MG- α 2 superior a X1, un nivel de AH superior a Y1, y un nivel de TIMP-1 superior a Z1, pero uno o más niveles inferiores a X2, Y2 ó Z2 se clasificaba como presentando un "estatus indeterminado". Se entiende que X2 generalmente es igual o superior a X1; Y2 generalmente es igual o superior a Y1 y Z2 generalmente es igual o superior a Z1.

15 El experto en la materia podrá seleccionar los valores de corte X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2 de MG- α 2, AH y TIMP-1 para conseguir uno o más parámetros clínicamente útiles, tal como una sensibilidad o especificidad, un valor predictivo negativo deseado, un valor predictivo positivo o una precisión deseados para una población de pacientes que presente una prevalencia particular de fibrosis. La metodología de optimización del diseño factorial, también conocida como Diseño de Experimentos, puede utilizarse para, por ejemplo, seleccionar los valores de corte apropiados. Tal como se da a conocer en la presente memoria, en el Ejemplo II, el software de optimización (DOE Keep It Simple Statistically, de Air Academy Associates (Colorado Springs, CO) se utilizó en un experimento de diseño central compuesto para variar simultáneamente los tres valores de corte X1, Y1 y Z1 y después para variar simultáneamente los tres valores de corte X2, Y2 y Z2. En particular, se varió el valor de corte de MG- α 2 entre 2,0 y 5,0 mg/ml; el valor de corte de AH se varió entre 25 y 75 ng/ml y el valor de corte de TIMP-1 se varió entre 1.000 y 1.700 ng/ml. Mediante la comparación de los resultados de ensayo determinados para los 194 pacientes en la base de datos (ver la Tabla 4) con los valores de corte asignados X1, Y1 y Z1, se determinó que cada una de las 194 muestras era un verdadero positivo, un verdadero negativo, un falso positivo o un falso negativo, y se determinaron los parámetros clínicos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y precisión para la población de pacientes de estudio. Aunque la determinación de los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 se ilustra en la presente memoria utilizando el programa KISS de ADE, el experto en la materia entenderá que también pueden utilizarse otros programas informáticos para identificar interacciones cooperativas entre múltiples variables y para llevar a cabo cálculos simultáneos de ecuaciones. Por ejemplo, el software de optimización ECHIP, disponible de ECHIP, Incorporated (Hockessin, DE) o el software de optimización Statgraphics, disponible de STSC, Incorporated (Rockville, MD) también pueden resultar útiles para determinar los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 que resultan útiles en los métodos de la invención.

20 Los parámetros clínicos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y precisión se calculan utilizando verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos. Una muestra "verdadero positivo" es una muestra positiva para el estadio indicado de fibrosis según la biopsia clínica, que además ha sido diagnosticada como positiva según un método de la invención. Una muestra "falso positivo" es una muestra negativa para el estadio indicado de fibrosis según la biopsia, que además ha sido diagnosticada como positiva según un método de la invención. De manera similar, una muestra "falso negativo" es una muestra positiva para el estadio indicado de fibrosis según la biopsia, que además ha sido diagnosticada como negativa según un método de la invención. Una muestra "verdadero negativo" es una muestra negativa para el estadio indicado de fibrosis según la biopsia, que además ha sido diagnosticada como negativa según un método de la invención. Ver, por ejemplo, Motulsky (editor), Intuitive Biostatistics, New York: Oxford University Press, 1995.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sensibilidad" se refiere a la probabilidad de que un método diagnóstico de la invención proporcione un resultado positivo en el caso de que la muestra sea positiva, por ejemplo

fibrótica con una puntuación Metavir de F2-F4. La sensibilidad se calcula como el número de resultados verdaderos positivos dividido por la suma de verdaderos positivos y falsos negativos. La sensibilidad esencialmente es una medida de lo bien que un método identifica correctamente los pacientes que presentan enfermedad fibrótica. En un método de la invención, los valores X1, Y1, Z1, X2, Y2 e Y2 pueden seleccionarse de manera que la sensibilidad del diagnóstico de un individuo sea de por lo menos aproximadamente 70%, y puede ser de, por ejemplo, por lo menos 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, o en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "especificidad" se refiere a la probabilidad de que un método diagnóstico de la invención proporcione un resultado negativo en el caso de que la muestra no sea positiva, por ejemplo que no sea del estadio Metavir de fibrosis F2-F4. La especificidad se calcula como el número de resultados verdaderos negativos dividido por la suma de verdaderos negativos y falsos positivos. La especificidad es esencialmente una medida de lo bien que un método excluye aquellos pacientes que no presentan fibrosis. En un método de la invención, los valores de corte X1, Y1, Z1, X2, Y2 e Y2 pueden seleccionarse de manera que, en el caso de que la sensibilidad del diagnóstico de un individuo sea de por lo menos aproximadamente 70%, la especificidad del diagnóstico de un individuo se encuentre comprendida en el intervalo de entre 70% y 100%, por ejemplo de por lo menos 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, o en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. Tal como se ilustra en el Ejemplo II, se alcanzó una especificidad superior al 98% y una sensibilidad de aproximadamente 77% en la población de pacientes no indeterminados, en la que aproximadamente 70% de la población de pacientes presentaba una prevalencia de fibrosis del 30%.

La expresión "valor predictivo negativo" tal como se utiliza en la presente memoria es sinónima de "VPN" y se refiere a la probabilidad de que un individuo que se ha diagnosticado que no presenta fibrosis realmente sí presente la enfermedad. El valor predictivo negativo puede calcularse como el número de resultados verdaderos negativos dividido por la suma de verdaderos negativos y falsos negativos. El valor predictivo negativo se determina a partir de las características del método diagnóstico, así como de la prevalencia de fibrosis en la población analizada. En un método de la invención, los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que el valor predictivo negativo en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 10% se encuentre comprendida en el intervalo de entre 75% y 99% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. Los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que el valor predictivo negativo en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 20% se encuentre comprendida en el intervalo de entre 75% y 99% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. Además, los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que el valor predictivo negativo en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30% se encuentre comprendida en el intervalo de entre 75% y 99% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, de por lo menos 95%, en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo.

La expresión "valor predictivo positivo" tal como se utiliza en la presente memoria es sinónima de "VPP" y se refiere a la probabilidad de que un individuo que se ha diagnosticado que no presenta fibrosis realmente sí presente la condición. El valor predictivo positivo puede calcularse como el número de resultados verdaderos positivos dividido por la suma de verdaderos positivos y falsos positivos. El valor predictivo positivo se determina a partir de las características del método diagnóstico, así como de la prevalencia de fibrosis en la población analizada. En un método de la invención, los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que, en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 10%, el valor predictivo positivo del método sea de por lo menos aproximadamente 75% y puede ser de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, o de por lo menos 95%, en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. Los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 también pueden seleccionarse de manera que, en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 20%, el valor predictivo positivo del método sea de por lo menos aproximadamente 75% y puede ser de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, o de por lo menos 95%, en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. De manera similar, los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 también pueden seleccionarse de manera que, en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30%, el valor predictivo positivo del método sea de por lo menos aproximadamente 75% y puede ser de por lo menos 80%, de por lo menos 85%, de por lo menos 90%, o de por lo menos 95%, en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo.

Los valores predictivos, incluyendo los valores predictivos negativos y positivos, están influidos por la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. En los métodos de la invención, los valores de corte X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2 pueden seleccionarse para producir un parámetro clínico deseado para una población clínica con una prevalencia particular de fibrosis hepática. Por ejemplo, pueden seleccionarse valores de corte para una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 25% ó 30%, las cuales pueden observarse en, por ejemplo, la consulta de un hepatólogo. Los valores de corte también pueden seleccionarse para una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% ó 8%, las cuales pueden ser representativas de la prevalencia de fibrosis observada en, por ejemplo, la consulta de un médico generalista.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "precisión" se refiere a la concordancia global entre el método diagnóstico y el estado de enfermedad. La precisión se calcula como la suma de los verdaderos positivos y los verdaderos negativos dividida por el número total de resultados muestrales y resulta afectada por la prevalencia de fibrosis en la población analizada. Los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que la precisión de un método de la invención en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 10% sea de por lo menos aproximadamente 80% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. Los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 también pueden seleccionarse de manera que la precisión de un método de la invención en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 20% sea de por lo menos aproximadamente 80% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo. De manera similar, los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 pueden seleccionarse de manera que la precisión de un método de la invención en una población de pacientes que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30% sea de por lo menos aproximadamente 80% y puede ser, por ejemplo, de por lo menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% en por lo menos 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, por ejemplo en por lo menos 65%, 70%, 75% ó 80% de la población de pacientes sometida a ensayo.

30 Métodos no limitados a marcadores específicos

También se da a conocer un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con un valor de corte X1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; mediante comparación de un nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con un valor de corte Y1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que, en una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 40%, por lo menos 65% de los individuos de la población son diagnosticados con una precisión de por lo menos 90%.

El método puede incluir, si se desea, comparar un nivel de un tercer marcador fibrótico Z en el individuo con un valor de corte Z1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z. En el método de la invención, el primer marcador fibrótico es MG- α 2, el segundo marcador fibrótico es AH y el tercer marcador fibrótico es TIMP-1.

En otra realización, los niveles de por lo menos estos tres marcadores fibróticos se comparan y, en una realización adicional, se comparan los niveles de exactamente tres marcadores fibróticos con los valores de corte respectivos de los mismos. En realizaciones adicionales, se comparan los niveles de por lo menos cuatro o por lo menos cinco marcadores fibróticos. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar la fibrosis leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa.

En una realización específica, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 65% de los individuos de una población con una prevalencia de la fibrosis de hasta 30% con una precisión de por lo menos 93%. En una realización adicional, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 70% de los individuos de una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 20% con una precisión de por lo menos 94%. En todavía una realización adicional, un método de la invención sirve para diagnosticar por lo menos 70% de los individuos en una población con una prevalencia de fibrosis de hasta 10% con una precisión de por lo menos 96%.

Los métodos de la invención proporcionan un rendimiento inigualado en el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática. Aunque no se proporciona un diagnóstico de todos los pacientes, la mayoría son diagnosticados con una precisión extremadamente buena. A título de ejemplo, en una población de pacientes con una prevalencia de fibrosis de aproximadamente 40%, prácticamente el 70% de la población son diagnosticados con

una precisión de más de 91% y con un valor predictivo positivo superior a 96% y un valor predictivo negativo superior a 89%. Este excelente rendimiento contrasta con métodos alternativos tales como el método de Poynard *et al.*, Lancet 357:1069, 2001. Mediante la utilización del método de Poynard *et al.* basado en el análisis de los seis marcadores MG- α 2, globulina- α 2, bilirrubina total, globulina- γ , apoA1 y GGT, sólo aproximadamente 50% de una población que presenta una prevalencia de fibrosis de aproximadamente 40% resulta diagnosticada, y sólo con una precisión de aproximadamente 89% (ver la Tabla 8). De esta manera, los métodos de la invención proporcionan una mejora, en el aspecto de que se diagnostica un porcentaje significativamente superior de una población de pacientes (aproximadamente 70%, comparado con aproximadamente 50%) y con una precisión superior al 91%, comparado con una precisión de aproximadamente 89% (ver la Tabla 8). Debido a las nuevas características de rendimiento del método de la invención, la biopsia típicamente no resulta necesaria en por lo menos 65% de la población de pacientes, y los pacientes diagnosticados pueden fiarse de un diagnóstico que presenta una precisión superior al 90%.

Al igual que otros métodos de la invención, puede utilizarse un método de la invención basado en la comparación de por lo menos tres marcadores fibróticos para diagnosticar la presencia o la severidad de la fibrosis hepática en un individuo que presenta, o que se sospecha que presenta, cualquier trastorno hepático, incluyendo la hepatitis vírica, una enfermedad hepática autoinmunitaria tal como la hepatitis autoinmunitaria, la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad hepática grasa o la enfermedad hepática inducida por medicamentos, o cualquiera de las de más enfermedades hepáticas indicadas anteriormente en la presente memoria. De manera similar, puede utilizarse un método de la invención basado en la comparación de por lo menos tres marcadores fibróticos para diagnosticar la presencia o la severidad de los trastornos fibróticos, incluyendo la fibrosis pulmonar, la fibrosis renal, la fibrosis prostática, la fibrosis mamaria o una enfermedad reumatoide, u otro trastorno fibrótico indicado en la presente memoria o conocido de la técnica.

Un método de la invención se basa en la comparación del nivel de un marcador fibrótico con un valor de corte predeterminado. Para los marcadores que se correlacionan positivamente con la fibrosis, la positividad está indicada por un nivel que es superior al del valor de corte predeterminado. Para los marcadores que se correlacionan negativamente con la fibrosis, la positividad está indicada por un nivel que es inferior al del valor de corte predeterminado. Los valores de corte que resultan útiles en los métodos de la invención pueden determinarse tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo utilizando el análisis del diseño de experimentos (ADE).

Respecto a los otros métodos diagnósticos de la invención, estos métodos pueden ponerse en práctica utilizando una diversidad de marcadores fibróticos conocidos de la técnica o indicados en la presente memoria. Entre dichos marcadores fibróticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, MG- α 2, AH, TIMP-1, PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 ó apoB. Se han indicado anteriormente en la presente memoria o son conocidos de la técnica marcadores fibróticos serológicos, bioquímicos, clínicos y ecográficos adicionales, y pueden incluirse en cualquier combinación en un método de la invención. Además, se entiende que la comparación entre el primer y el segundo marcadores fibróticos y cualesquiera marcadores fibróticos adicionales puede llevarse a cabo simultáneamente o en cualquier orden y utilizando cualquier combinación de formatos de ensayo.

Tal como se ha indicado anteriormente, el "nivel" de un marcador fibrótico puede ser una cantidad relativa o absoluta de, por ejemplo, ARN, proteína o actividad y puede ser una medida directa o indirecta del marcador fibrótico. Además, el valor del nivel puede obtenerse de una fuente secundaria, tal como un médico o un laboratorio diagnóstico, o puede determinarse utilizando cualquier muestra y ensayo convenientes, incluyendo, aunque sin limitación, los indicados anteriormente en la presente memoria. Entre los métodos que resultan útiles para determinar el nivel de un marcador fibrótico para llevar a cabo las comparaciones incluidas en los métodos de la invención se incluyen, por ejemplo, métodos de hibridación tales como PCR-RT y el análisis de transferencia de ARN, inmunoensayos, incluyendo los ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) y los radioinmunoensayos (RIA), los inmunoensayos de tipo sándwich, la transferencia western cuantitativa y otros ensayos estándares para determinar los niveles de las proteínas y, en caso aplicable, ensayos de la actividad del marcador fibrótico. Dichos ensayos son rutinarios de la técnica y se han indicado anteriormente en la presente memoria.

La presente invención proporciona además un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con un valor de corte X1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; la comparación del nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con un valor de corte Y1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que los valores de corte X1 e Y1 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada.

El método de la invención incluye las etapas de comparar el nivel de un tercer marcador fibrótico Z en el individuo con un valor de corte Z1 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el

5 diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z, en el que los valores de corte X1, Y1 y Z1 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada, en la que se comparan los niveles de MG- α 2, AH y TIMP-1. En otras realizaciones se comparan los niveles de exactamente tres, por lo menos tres, por lo menos cuatro o por lo menos cinco marcadores fibróticos. Un método de la invención puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar la fibrosis leve o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa. Los valores de corte pueden optimizarse tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo utilizando el análisis ADE.

10 La invención proporciona además un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante comparación del nivel de un primer marcador fibrótico X en el individuo con dos valores de corte X1 y X2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el primer marcador fibrótico X; la comparación del nivel de un segundo marcador fibrótico Y en el individuo con dos valores de corte Y1 e Y2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el segundo marcador fibrótico Y, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en la positividad o negatividad de X e Y, en el que, en la que los valores de corte X1, Y1, X2 e Y2 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada. Entre dichas características de rendimiento se incluyen sensibilidades, especificidades, VPP, VPV y precisiones particulares, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria.

20 El método de la invención incluye además las etapas de comparar un nivel del tercer marcador fibrótico Z en el individuo con dos valores de corte Z1 y Z2 con el fin de determinar si el individuo es positivo para el tercer marcador fibrótico Z y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la positividad o negatividad de X, Y y Z, en el que los valores de corte X1, Y1, Z1, X2, Y2 y Z2 se optimizan individualmente, proporcionando una característica de rendimiento deseada. En un método de la invención, los valores de corte pueden optimizarse convenientemente, por ejemplo utilizando el análisis ADE.

25 Metodología

30 Puede resultar útil una diversidad de medios para detectar MG- α 2, AH y TIMP-1 y para determinar un nivel de MG- α 2, AH y TIMP en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de proteína MG- α 2 en una muestra del individuo que debe diagnosticarse, utilizando, por ejemplo, uno o más de los agentes de unión específicos de MG- α 2, tales como anticuerpos anti-MG- α 2. En otra realización, se pone en práctica un método de la invención mediante el ensayo de la actividad de MG- α 2 en una muestra del individuo.

35 También puede utilizarse una diversidad de medios en un método de la invención con el fin de detectar AH o para determinar un nivel de AH en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de AH en una muestra utilizando uno o más agentes de unión específicos de AH, tales como proteínas de unión a AH o anticuerpos anti-AH.

40 De manera similar, también puede utilizarse una diversidad de medios en un método de la invención con el fin de detectar TIMP-1 ó para determinar el nivel de TIMP-1 en una muestra. En una realización, la invención se pone en práctica mediante la determinación del nivel de proteína TIMP-1 en una muestra del individuo que debe diagnosticarse. El nivel de proteína TIMP-1 puede determinarse, por ejemplo, utilizando uno o más agentes específicos de TIMP-1, tales como anticuerpos anti-TIMP-1. En otra realización, la invención se pone en práctica mediante el ensayo de la actividad de TIMP-1 en una muestra del individuo que debe diagnosticarse.

45 En una realización particular, la invención proporciona un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la determinación del nivel de proteína MG- α 2 en una muestra del individuo; la determinación del nivel de AH en una muestra del individuo, y la determinación del nivel de proteína TIMP-1 en una muestra del individuo y el diagnóstico de la presencia o severidad de fibrosis hepática en el individuo basándose en los niveles de proteína MG- α 2, AH y proteína TIMP-1. Si se desea, puede determinarse cada uno de los niveles de proteína MG- α 2, AH y proteína TIMP-1 utilizando un ensayo ligado a enzima.

50 En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de fibrosis de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo mediante la puesta en contacto de una dilución apropiada de una muestra del individuo con anticuerpo anti-MG- α 2 bajo condiciones adecuadas para formar un primer complejo de MG- α 2 y anticuerpo anti-MG- α 2, el lavado del primer complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de primer complejo que contiene MG- α 2, el contacto de una dilución apropiada de una muestra del individuo con una proteína de unión a AH bajo condiciones adecuadas para formar un segundo complejo de AH y proteína de unión a AH, el lavado del segundo complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de segundo complejo que contiene AH, el contacto de una dilución apropiada de una muestra del individuo con anticuerpo anti-TIMP-1 bajo condiciones adecuadas para formar un tercer complejo de TIMP-1 y anticuerpo anti-TIMP-1, el lavado del tercer complejo para eliminar moléculas no unidas, la determinación de la cantidad de tercer complejo que contiene TIMP-1, y la diferenciación de la fibrosis hepática leve

o la ausencia de la misma de la fibrosis hepática moderada a severa en el individuo basándose en las cantidades de complejos que contienen MG- α 2, AH o TIMP-1.

5 Se entiende que la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1, o la detección de MG- α 2, AH y YKL-40, tal como se comenta en mayor detalle posteriormente, puede llevarse a cabo mediante el ensayo para la cantidad de proteína o polisacárido de manera directa, o, en el caso de MG- α 2 y TIMP-1, puede determinarse mediante el ensayo para los niveles de ARN o de actividad enzimática de una proteasa regulada por MG- α 2 ó TIMP-1. De manera simialr, en el caso de que se detecte uno o más marcadores fibróticos adicionales en un método de la invención, el marcador puede someterse a ensayo directamente, o puede someterse a ensayo un precursor, tal como ARN, o un producto de degradación o proteolítico, o una actividad correlacionada con los niveles del marcador. Se entiende que la determinación de un nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 y YKL-40, o de un nivel de cualquier marcador adicional de fibrosis, puede llevarse a cabo utilizando valores absolutos, por ejemplo para niveles de ARN o proteína o actividad enzimática, o pueden determinarse como valores relativos en comparación con uno o más valores de referencia.

15 Se entiende además que cada uno de los tres ensayos de marcador fibrótico (MG- α 2/AH/TIMP-1 ó MG- α 2/AH/YKL-40), así como cualesquiera ensayos adicionales, se llevan a cabo independientemente de los demás, en cualquier orden, y que cualquier combinación de formatos de ensayo se encuentra comprendida en la invención. A título de ejemplo, puede determinarse un nivel de MG- α 2 y AH mediante el ensayo para la concentración de MG- α 2 y AH, mientras que se determina un nivel de TIMP-1 mediante el ensayo para la actividad enzimática de TIMP-1. A título de ejemplo adicional, puede determinarse un nivel de MG- α 2 utilizando un radioinmunoensayo, mientras que se determinan los niveles de AH y de TIMP-1 utilizando ensayos ligados a enzima. El experto en la materia entenderá que la detección de los tres marcadores fibróticos (MG- α 2/AH/TIMP-1 ó MG- α 2/AH/YKL-40) y la detección de cualesquiera marcadores adicionales pueden llevarse a cabo simultáneamente o en cualquier orden. Además, puede obtenerse una sola muestra, tal como una muestra de suero, de un individuo, y subdividirse en tres partes para detectar MG- α 2, AH y TIMP-1 ó MG- α 2, AH y TIMP-1, o los marcadores pueden detectarse utilizando diferentes muestras, que pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes y pueden encontrarse no diluidas o diluidas en el mismo grado o en grados diferentes. En el caso de que se utilicen dos o más muestras, las muestras habitualmente se obtienen del individuo en un intervalo de tiempo relativamente corto, por ejemplo varios días a varias semanas.

30 Métodos de ARN

PUeden utilizarse métodos de hibridación para detectar ARNm de MG- α 2 ó de TIMP-1 ó para determinar el nivel de ARNm de MG- α 2 ó de TIMP-1 de otro marcador fibrótico que resulte útil en la invención, tal como YKL-40. Son bien conocidos de la técnica numerosos métodos para determinar los niveles de ARNm mediante hibridación específica o selectiva con una sonda de ácidos nucleicos complementaria. Entre dichos métodos se incluyen procedimientos de hibridación en solución, así como procedimientos de hibridación en fase sólida en los que la sonda o muestra se inmoviliza sobre un soporte sólido. Entre los ejemplos específicos de métodos útiles se incluyen métodos de amplificación tales como los métodos de amplificación de diana y señal y entre ellos se incluyen la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la PCR-transcriptasa inversa (PCR-RT), la amplificación mediada por la transcripción (Gen-Probe Incorporated, San Diego, CA), la amplificación de ADN de cadena ramificada (ADNr) (Bayer Diagnostics, Emeryville, CA), la amplificación con desplazamiento de cadena (ADC, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y la amplificación por reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Entre los métodos adicionales que resultan útiles en la invención se incluyen la protección frente a ARNasa, el análisis de transferencia northern u otra transferencia de ARN, la transferencia por puntos o la tecnología basada en membranas; la tira "dip stick"; las agujas y las matrices bidimensionales inmovilizadas sobre un chip. Las condiciones para la determinación de los niveles de ARNm son bien conocidas de la técnica utilizando procedimientos de hibridación tanto en solución como en fase sólida, tal como se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (suplemento nº 47), John Wiley & Sons, New York, 1999.

50 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR-RT, puede resultar útil en los métodos de la invención. La PCR o la PCR-RT pueden llevarse a cabo con ARN aislado o en bruto o en muestras parcialmente fraccionadas, por ejemplo células peletizadas a partir de una muestra de sangre completa. Los métodos de PCR son bien conocidos de la técnica, tal como se describen, por ejemplo, en Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York, 1995. Los formatos multimuestra, tales como las matrices bidimensionales, ofrecen la ventaja de analizar numerosas muestras diferentes en un único ensayo. Los métodos basados en tiras dipstick de fase sólida también pueden resultar útiles en la invención y ofrecen la ventaja de poder analizar con rapidez una muestra líquida y obtener un resultado inmediato.

60 Las sondas para la detección de ARNm de MG- α 2 y TIMP-1 ó para determinar los niveles de ARNm de MG- α 2 y TIMP-1, son bien conocidos de la técnica. El experto en la materia podrá utilizar, por ejemplo, una sonda correspondiente a parte o la totalidad de la secuencia de ácidos nucleicos de MG- α 2 humana mostrada en la figura 1 (SEC ID nº 1) o parte o la totalidad de la secuencia de ácidos nucleicos de la TIMP-1 humana mostrada en la figura 3, respectivamente. Las condiciones apropiadas para los diversos formatos de ensayo para la detección del ARNm

de MG- α 2 y TIMP-1 ó para la determinación de los niveles de ARNm de MG- α 2 y TIMP-1 son bien conocidos de la técnica o pueden establecerse utilizando métodos rutinarios. A título de ejemplo, se indican las condiciones y sondas para el análisis de transferencia northern del ARNm de MG- α 2, por ejemplo en Ortego *et al.*, *supra*, 1997. A título de ejemplo adicional, se indican las condiciones y sondas para la hibridación de transferencia en ranura de ARN para determinar la expresión del ARN de MG- α 2 en muestras humanas en Simon *et al.*, *supra*, 1996. De manera similar, el análisis de transferencia northern del ARN de TIMP-1 en muestras humanas puede llevarse a cabo tal como se describe en, por ejemplo, Yoshiji *et al.*, *supra*, 1996; los ensayos de PCR-RT de TIMP-1 en muestras humanas también son bien conocidos de la técnica y se describen en, por ejemplo, Janowska-Wieczorek *et al.*, *supra*, 2000, y en Groft *et al.*, *supra*, 2001. El experto en la materia entenderá que estos ensayos y otros pueden resultar útiles para detectar el ARN de MG- α 2, TIMP-1 ó YKL-40 ó para determinar los niveles de ARN de MG- α 2, TIMP-1 ó YKL-40 ó los niveles de otros marcadores fibróticos que resultan útiles en los métodos de la invención.

Inmunoensayos

Una diversidad de formatos de inmunoensayo, incluyendo los formatos de inmunoensayo competitivo y no competitivo, ensayos de captura de antígeno y ensayos de tipo sándwich de dos anticuerpos también resultan útiles en los métodos de la invención (Self y Cook, Curr. Opin. Biotechnol. 7:60-65, 1996). En una realización, un método de la invención se basa en uno o más ensayos de captura de antígeno. En un ensayo de captura de antígeno, se une un anticuerpo a una fase sólida y se añade muestra de manera que MG- α 2, AH, TIMP-1, YKL-40 u otro antígeno marcador de fibrosis sea ligado por el anticuerpo. Tras eliminar mediante lavado las proteínas no unidas, puede cuantificarse la cantidad de antígeno unido, si se desea utilizando, por ejemplo, un radioensayo (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). El experto en la materia entenderá que los inmunoensayos útiles en la invención se llevan a cabo bajo condiciones de exceso de anticuerpos, o como competiciones de anticuerpos, con el fin de cuantificar la cantidad de antígeno y, de esta manera, determinar el nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40.

Los ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) pueden resultar útiles en los métodos de la invención. Un enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa o la ureasa puede unirse, por ejemplo, a un anticuerpo anti-MG- α 2, anti-AH, anti-TIMP-1 ó anti-YKL-40 ó a un anticuerpo secundario para la utilización en un método de la invención. Puede utilizarse un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que rinde un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que resulta detectable a 450 nm. Entre otros sistemas ligados a enzima convenientes se incluyen, por ejemplo, el sistema de detección de fosfatasa alcalina, que puede utilizarse con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, rindiendo un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, puede utilizarse un sistema de detección de β -galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), rindiendo un producto soluble detectable a 410 nm, o puede utilizarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como violeta de urea-bromocresol (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Pueden obtenerse anticuerpos primarios y secundarios ligados a enzima que resultan útiles, a partir de varias fuentes comerciales, tales como Jackson Immuno-Research (West Grove, Pa), tal como se describe en mayor detalle posteriormente.

La detección quimioluminiscente también puede resultar útil para detectar MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40, o para determinar el nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 u otro marcador fibrótico según un método de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos secundarios quimioluminiscentes comercialmente de diversas fuentes, tales como Amersham.

La detección fluorescente también puede resultar útil para detectar MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40, o para determinar el nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 u otro marcador fibrótico en un método de la invención. Entre los fluorocromos útiles se incluyen, aunque sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficoeritina, B-ficoeritina, R-ficoeritina, rodamina, rojo de Texas y lisamina. Pueden resultar útiles en la invención los agentes de unión específicos de MG- α 2, de AH, de TIMP-1 ó de YKL-40 marcados con fluoresceína o rodamina, tales como anticuerpos anti-MG- α 2, anti-AH, anti-TIMP-1 ó anti-YKL-40, o anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína o rodamina. Pueden obtenerse anticuerpos fluorescentes útiles comercialmente, por ejemplo de Tago Immunologicals (Burlingame, CA), tal como se describe en mayor detalle posteriormente.

Los radioinmunoensayos (RIA) también pueden resultar útiles en los métodos de la invención. Dichos ensayos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, Brophy *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 167:898-903, 1990, describe un radioinmunoensayo para la detección de TIMP-1, y Pharmacia fabrica un ensayo radiométrico para la cuantificación de AH utilizando una proteína de unión a AH marcada con ^{125}I (Guechot *et al.*, Clin. Chem. 42:558-563, 1996). Pueden llevarse a cabo radioinmunoensayos, por ejemplo con anticuerpo primario o secundario marcado con ^{125}I (Harlow y Lane, *supra*, 1988).

Puede analizarse una señal de un reactivo detectable, por ejemplo utilizando un espectrofotómetro, para detectar

color procedente de un sustrato cromogénico, un contador de radiación para detectar radiación, tal como un contador gamma para la detección de ^{125}I , o un fluorímetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una determinada longitud de onda. En el caso de que se utilice un ensayo ligado a enzima, puede llevarse a cabo el análisis cuantitativo de la cantidad de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 u otro marcador fibrótico, utilizando un espectrofotómetro, tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices, Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se entiende que los ensayos de la invención pueden automatizarse o llevarse a cabo robóticamente, si se desea, y que puede detectarse simultáneamente la señal de múltiples muestras.

Los métodos de la invención también comprenden la utilización de inmunoensayos basados en la electroforesis capilar (IEEC), que puede encontrarse automatizada, si se desea. También pueden utilizarse inmunoensayos conjuntamente con fluorescencia inducida por láser, tal como se describe, por ejemplo, en Schmalzing y Nashabeh, *Electrophoresis* 18:2184-93, 1997, y en Bao, J. *Chromatogr., B. Biomed. Sci.* 699:963-80, 1997. Los inmunoensayos de liposomas, tales como los inmunoensayos de inyección de flujo de liposomas y los inmunosensores de liposomas, también pueden utilizarse para detectar MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40, o para determinar el nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 u otro marcador fibrótico según un método de la invención (Rongen *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204: 105-133, 1997).

Los inmunoensayos enzimáticos de tipo sándwich también pueden resultar útiles en los métodos de la invención. En un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos, se une un primer anticuerpo a un soporte sólido y se deja que el antígeno se una al primer anticuerpo. La cantidad de MG- α 2, AH, TIMP-1, YKL-40 u otro antígeno marcador fibrótico se cuantifica mediante la medición de la cantidad de un segundo anticuerpo que se une al marcador fibrótico.

A título de ejemplo, un inmunoensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos puede resultar útil para determinar el nivel de TIMP-1, tal como se describe en Murawaki *et al.*, *supra*, 1993. Brevemente, se diluye suero (25 ml) 41 veces con tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,0 (1,0 ml). La muestra diluida (20 ml) se mezcla con 0,3 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, que contiene 50 ng/ml de anticuerpo monoclonal (Fab del clon 7-6C1) marcado con peroxidasa de rábano picante, albúmina de suero bovino al 1%, Tween-20 al 0,1%, NaCl 0,1 M y timerosal al 0,005%. Se transfiere una alícuota de 0,1 ml de la solución mezclada a cada pocillo de microplaca previamente recubierto con un segundo anticuerpo monoclonal (clon 7-23G9) que presenta una especificidad de epítipo diferente, y la placa se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. La placa se lava tres veces con 0,3 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, que contiene Tween-20 al 0,1% y NaCl 0,1 M. La actividad de peroxidasa unida a la placa se somete a ensayo mediante una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente con 0,1 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato sódico 0,15 M, pH 4,9, que contiene 0,5 mg/ml de o-fenilendiamina y H_2O_2 al 0,02%. Tras detener la reacción mediante la adición de 0,1 ml de H_2SO_4 2 N, se mide la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas utilizando un estándar de TIMP-1 de suero humano. La linealidad de la relación entre la cantidad de TIMP-1 y la absorbancia a 492 nm se demuestra mediante representación en escala logarítmica y proporciona un intervalo de ensayo de entre aproximadamente 1,5 y 300 mg/pocillo.

La transferencia western cuantitativa también puede utilizarse para detectar MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40, o para determinar el nivel de MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 u otro marcador fibrótico en un método de la invención. Las transferencias western pueden cuantificarse mediante métodos bien conocidos, tales como la densitometría de escaneo. A título de ejemplo, se someten a electroforesis muestras de proteínas en geles Laemmli de SDS-PAGE al 10%. Los anticuerpos monoclonales murinos primarios, por ejemplo contra MG- α 2, AH, TIMP-1 ó YKL-40 humanos se hacen reaccionar con el filtro de transferencia y la unión de anticuerpos se confirma que es lineal utilizando un experimento preliminar de transferencia en ranura. Se utilizan anticuerpos de cabra antirratón acoplados a peroxidasa de rábano picante (BioRad) como el anticuerpo secundario y se lleva a cabo la detección de la señal utilizando la quimioluminiscencia, por ejemplo con el kit Renaissance de quimioluminiscencia (New England Nuclear, Boston, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizan autorradiografías de los filtros utilizando un densitómetro de escaneo (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) y se normalizan respecto a un control positivo. Los valores se expresan, por ejemplo, en forma de proporción entre el valor real y el control positivo (índice densitométrico). Dichos métodos son bien conocidos de la técnica, tal como se describen en, por ejemplo, Parra *et al.*, *J. Vasc. Surg.* 28:669-675, 1998.

Fuentes de anticuerpos

Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, los inmunoensayos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los ensayos de inmunosorción ligada a enzima y el análisis de transferencia western cuantitativo, pueden resultar útiles en los métodos diagnósticos de la invención. Dichos ensayos se basan en uno o más anticuerpos, por ejemplo los anticuerpos anti-MG- α 2, anti-AH, anti-TIMP-1 ó anti-YKL-40. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio para incluir los anticuerpos policlonales y monoclonales, así como los fragmentos polipeptídicos de anticuerpos que conservan una actividad de unión de MG- α 2, AH, TIMP-1, YKL-40 ó del antígeno marcador fibrótico relevante de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. El experto en la materia entenderá que los fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos de los anticuerpos anti-MG- α 2, anti-

5 AH, anti-TIMP-1 y anti-YKL-40, e incluyendo los fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv, pueden conservar actividad de unión para el antígeno marcador fibrótico relevante y, de esta manera, se encuentran incluidos dentro de la definición del término anticuerpo utilizada en la presente memoria. Los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales son rutinarios de la técnica, tal como se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, 1988.

10 El término anticuerpo, tal como se utiliza en la presente memoria, también comprende los anticuerpos y fragmentos de origen no natural que contienen, como mínimo, un dominio V_H y un dominio V_L, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos Fv de una cadena (scFv) que se unen específicamente a MG-α2, AH, TIMP-1, YKL-40 ó al antígeno marcador fibrótico relevante. Dichos anticuerpos de origen no natural pueden construirse utilizando la síntesis peptídica en fase sólida, producirse recombinantemente u obtenerse, por ejemplo, mediante cribado de bibliotecas combinatoriales que consisten de cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables, tal como se describe en Borrebaeck (editor), *Antibody Engineering* (segunda edición), New York, Oxford University Press, 1995.

15 Son bien conocidos de la técnica una diversidad de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-MG-α2, anti-AH, anti-TIMP-1 y anti-YKL-40 que resultan útiles y, en muchos casos, que se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, se encuentra disponible de Beckman Coulter un ensayo nefelométrico para la macroglobulina-α2 (kit n° 449430) y los anticuerpos purificados por afinidad de cabra anti-MG-α2 humana y de cabra anti-MG-α2 humana marcado con peroxidasa para ELISA y transferencia western, por ejemplo de Cedarlane Laboratories Limited (CL20010AP y CL20010APHP) y de Affinity Biologicals Incorporated (GAA2MAP y GAA2M-APHRP). De manera similar, puede obtenerse anticuerpo purificado por afinidad de oveja anti-AH de Biotrend (n° 5029-9990).

20 Los anticuerpos anti-TIMP-1 humano también se encuentran fácilmente disponibles de una diversidad de fuentes comerciales. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 humano n° 147-6D11 resulta adecuado para ensayos ELISA o análisis de transferencia western y puede obtenerse de Medicorp, Inc. (Montréal, Canada) y el anticuerpo monoclonal anti-TIMP-1 humano n° MAB970 se encuentra disponible de R&D Systems, Inc., para la utilización en, por ejemplo, transferencia western o ensayos ELISA de tipo sándwich. MAB970 puede combinarse, por ejemplo, con anticuerpo anti-TIMP-1 humano biotilado (BAF970) de R&D Systems, Inc., para la detección de TIMP-1 mediante ELISA de tipo sándwich. Además, puede obtenerse anticuerpo policlonal de conejo anti-TIMP-1 humano y anticuerpos monoclonales de ratón antihumanos, que resultan adecuados, por ejemplo, para la transferencia western con detección incrementada de quimioluminiscencia, de Research Diagnostics Inc. (RDI-TIMP1abr y RDI-TIMP1-C1).

35 Ensayos de actividad

40 Tal como se ha comentado anteriormente, los ensayos basados en la actividad de un marcador fibrótico también pueden resultar útiles para detectar MG-α2, AH o TIMP-1 o para determinar el nivel de MG-α2, AH o TIMP-1 u otro marcador fibrótico y, por lo tanto, resultan útiles en los métodos de la invención. A título de ejemplo, una diversidad de ensayos de la actividad de MG-α2 puede resultar útil para detectar MG-α2 o para determinar el nivel de MG-α2 en una muestra en un método de la invención. Debido a que las proteasas de unión a MG-α2 muestran una actividad proteolítica inhibida pero conservan la capacidad de hidrolizar enlaces amida y éster de sustratos pequeños, puede detectarse la MG-α2, o determinarse un nivel de la misma, mediante el ensayo de la inhibición de la actividad de tripsina, subtilisina, quimotripsina, plasmina, elastasa, termolisina o papaína o la actividad de otra proteasa diana sin inhibición de la actividad amidolítica. Algunos sustratos tales como la caseína marcada o la fibrina marcada pueden resultar útiles para el ensayo para la inhibición de la actividad de la proteasa diana. Además, basándose en su amplia especificidad de sustrato proteasa, puede determinarse el nivel de MG-α2 mediante el ensayo para la inhibición de la actividad de dos o más proteasas diana utilizando, por ejemplo, caseína-¹⁴C y fibrina-¹²⁵I (Armstrong *et al.*, *supra*, 1999). La MG-α2 también puede detectarse, o determinarse el nivel de MG-α2, basándose en la capacidad de la MG-α2 de proteger una proteasa unidad frente a un anticuerpo o un inhibidor de elevado peso molecular. Tras la reacción de una muestra con, por ejemplo, tripsina y después inhibidor de tripsina, se somete a ensayo la actividad residual de tripsina con un sustrato de bajo peso molecular, tal como la amida BA_pNA (Ganrot, *supra*, 1966; Armstrong *et al.*, *supra*, 1985). La actividad de tripsina tras el tratamiento con inhibidor de tripsina es indicativa de MG-α2. Estos ensayos y otros ensayos bien conocidos de la actividad de MG-α2 pueden resultar útiles en los métodos de la invención.

55 De manera similar, los ensayos de actividad de TIMP-1 son bien conocidos de la técnica. En particular, un ensayo para la capacidad de inhibir la actividad de proteasa de una metaloproteinasas de matriz, por ejemplo utilizando la zimografía inversa en gelatina. La zimografía inversa en gelatina se lleva a cabo mediante la inclusión de una gelatinasa, tal como la gelatinasa A, en una mezcla de gel con el sustrato gelatina. El medio condicionado, tal como medio condicionado procedente de células renales de hámster neonato pueden utilizarse como una fuente conveniente de gelatinasa. Se sometieron a electroforesis muestras de plasma y se analizó el patrón resultante, por ejemplo mediante digitación con escáner utilizando un escáner Hewlett Packard. Se observó actividad de TIMP-1 como una reducción de la degradación de la gelatina. Ver, por ejemplo, Kossakowska *et al.*, *supra*, 1998. El experto

en la materia reconocerá que estos ensayos y otros ensayos rutinarios de la actividad de TIMP-1 pueden resultar útiles en los métodos de la invención.

Marcadores adicionales

5 Resulta evidente que los métodos de la invención pueden ponerse en práctica, si se desea, mediante la detección de los tres marcadores MG- α 2, AH y TIMP-1 sin someter a ensayo cualesquiera marcadores adicionales o evaluar cualesquiera otras características clínicas o ecográficas. Además, estos tres ensayos pueden utilizarse como un panel en combinación con uno o más ensayos adicionales de marcador fibrótico o la evaluación de una o más variables clínicas o ecográficas. En realizaciones específicas, la invención proporciona un método de diagnóstico de la presencia o severidad de fibrosis hepática en un individuo mediante la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1 en una muestra y también la detección de por lo menos uno de los marcadores siguientes: PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 ó apoB. En una realización, un método de la invención para el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática incluye las etapas de detección de MG- α 2, AH, TIMP-1 y YKL-40 en una muestra. En una realización adicional, un método de la invención se encuentra limitado a la detección de MG- α 2, AH, TIMP-1 e YKL-40, y no se detecta ningún marcador fibrótico adicional.

20 En vista de lo anteriormente expuesto, resulta evidente que pueden combinarse los ensayos de uno o más marcadores de fibrosis bioquímicos o séricos adicionales o la evaluación de una o más variables clínicas o ecográficas asociadas a fibrosis con la detección de MG- α 2, AH y TIMP-1 con el fin de diagnosticar la presencia o la severidad de la fibrosis hepática. Entre los ejemplos de marcadores bioquímicos y séricos adicionales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 y apoB. Entre los marcadores bioquímicos y séricos adicionales que resultan útiles en la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, colágenos tales como el colágeno de tipo I, la fibronectina, la vitronectina, la endotelina, la undulina; moléculas de adhesión tales como selectinas, moléculas vasculares de adhesión celular (MVAC) y moléculas de adhesión intercelular (MAIC); citoquinas proinflamatorias tales como el factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), la pseudocolinesterasa, la manganeso superóxido-dismutasa, la N-acetil- β -glucosaminidasa (β -NAG), la glutatión peroxidasa, el factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), el receptor de FCDP, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (PQM-1), la óxido nítrico sintetasa inducible, la nitrotirosina, la bilirrubina, la ferritina y la α -fetoproteína, la γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT), la aspartato aminotransferasa (AST), la alanino aminotransferasa (ALT), la proporción AST/ALT, la albúmina, las globulinas- γ , el bloque- $\beta\gamma$, el índice protrombina, la puntuación de Child-Pugh, el índice PGA (tiempo de protrombina, concentración de GGT y concentración de apoA1), el índice PGAA (puntuación PGA con nivel de macroglobulina- α 2), la hemoglobina, el volumen corpuscular medio, el recuento de linfocitos, el colesterol, la urea, la creatinina, el sodio y el recuento de plaquetas.

40 Una variable clínica o ecográfica también puede ser un "marcador" fibrótico que resulte útil en los métodos de la invención. De esta manera, el análisis de una o más variables clínicas o ecográficas puede combinarse con la detección de MG-2 α , AH y TIMP-1 con el fin de diagnosticar la presencia o severidad de la fibrosis hepática u otro trastorno fibrótico, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria. A título de ejemplos, dicha variable clínica puede ser la edad o sexo del paciente, o la presencia de eritema palmar, contractura de Dupuytren, dedos "en palillo de tambor", arañas vasculares, hígado firme, esplenomegalia o circulación colateral. Entre las variables ecográficas que resultan útiles en un método de la invención se incluyen, por ejemplo, la longitud del hígado (riñón derecho), una superficie hepática irregular, heterogeneidad hepática, la longitud del bazo, ascites o circulación colateral. Ver, por ejemplo, Oberti *et al.*, Gastroenterol. 113:1609-1616, 1997. Se entiende que el análisis de estas variables y otras variables clínicas o ecográficas bien conocidas puede resultar útil en un método de la invención. Además, un método de la invención comprende la determinación de la variable clínica o ecográfica, por ejemplo, la palpación del hígado, o puede basarse en una o más variables clínicas o ecográficas históricas o determinadas anteriormente.

55 Los ensayos para la detección de marcadores bioquímicos o séricos que resultan útiles en la invención son bien conocidos de la técnica y en muchos casos se encuentran disponibles comercialmente. Entre dichos ensayos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, métodos basados en la amplificación, tales como la PCR-RT y otros métodos para el análisis cuantitativo de los niveles de ARN; inmunoensayos tales como los radioinmunoensayos, los ensayos ligados a enzimas, los ensayos de tipo sándwich de dos anticuerpos y el análisis de transferencia western cuantitativo y ensayos de la actividad biológica, tal como la actividad enzimática. Los ensayos de PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 ó apoB se encuentran disponibles comercialmente de diversas fuentes, tal como se resume en la Tabla 1.

60 Los ensayos de marcadores bioquímicos o séricos adicionales que pueden combinarse con la detección de MG- α 2,

AH y TIMP-1 en un método de la invención también son bien conocidos de la técnica. La fibronectina, por ejemplo, puede someterse a ensayo convenientemente mediante ensayo turbidimétrico disponible de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). La pseudocolinesterasa (PCHE) puede someterse a ensayo utilizando metodología estándar disponible de Boehringer. Los niveles de la N-acetil- β -glucosaminidasa (β -NAG) pueden determinarse mediante ensayo de la actividad enzimática utilizando un kit disponible de Cortecs diagnostics. Los niveles de manganeso superóxido-dismutasa (Mn-SOD) pueden determinarse convenientemente mediante ELISA utilizando un kit disponible, por ejemplo, de Bender MedSystem. Los niveles de glutatión peroxidasa pueden determinarse mediante ensayo de la actividad enzimática utilizando, por ejemplo, un kit disponible de Randox Laboratories Ltd. (Oceanside, CA).

10

TABLA 1 FUENTES COMERCIALES DE ENSAYOS DE MARCADORES FIBRÓTICOS			
Marcador	Compañía	Ensayo	Número de catálogo
PIIINP	Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia)	RIA	05903
laminina	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM310
tenascina	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM320
colágeno de tipo IV	Iatron Laboratories (Tokyo, Japón)	RIA	KCAD1
YKL-40	Metra Biosystems (Mountain View, CA)	ELISA	8020
MMP-3	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2613
MMP-2	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2617
Complejo MMP-9/TIMP-1	SBA Sciences (Turku, Finlandia)	ELISA	MP2215
ligando sFas	Bender MedSystems Diagnostics (Vienna, Austria)	ELISA	BMS260/2
TGF- β 1	R&D Systems (Minneapolis, MN)	ELISA	DB100
IL-10	R&D Systems (Minneapolis, MN)	ELISA	HS100B
apoA1	AlerChek, Inc. (Portland, ME)	ELISA	A70101
apoA2	AlerChek, Inc. (Portland, ME)	ELISA	A70102
apoB	Sigma Diagnostics (St. Louis, MO)	IT*	357-A
* inmunoturbidimétrico			

15 Los niveles totales o directos de bilirrubina, GGT, AST y ALT pueden determinarse utilizando un autoanalizador, tal como Hitachi 917 Automate (Mannheim, Alemania) con reactivos de Roche Diagnostics. Los niveles de albúmina pueden determinarse, por ejemplo, mediante el método del verde bromocresol, tal como se describe en Doumas *et al.*, Clin. Chim. Acta 31:87-96, 1971, y los niveles de ferritina y de α -fetoproteína pueden determinarse convenientemente utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo disponible de Boehringer. Además, los niveles de globulina- α_1 , globulina- α_2 , globulina- β y globulina- γ pueden determinarse, por ejemplo, mediante electroforesis de proteínas séricas en un sistema automático (Hydrasys e Hyrys, Sebia; Issy-Les-Moulineaux, Francia). Los métodos para determinar la actividad de protrombina también son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen el método de coagulación de Organon Technika (West Orange, NJ). El índice PGA puede determinarse tal como se describe en Poynard *et al.*, Gastroenterol. 100:1397-1402, 1991, y el índice PGAA también puede determinarse mediante métodos bien conocidos, tal como se describe en Naveau *et al.*, Dig. Dis. Sci. 39: 2426-2432, 1994).

25 Los recuentos de plaquetas, recuentos de linfocitos, volumen corpuscular medio y variables asociadas pueden determinarse mediante una diversidad de metodologías utilizando, por ejemplo, un analizador Bayer-Technicon H2 (Bayer-Technicon Instruments, Tarrytown, NY). Los niveles de colesterol pueden determinarse mediante metodologías estándares, disponibles de, por ejemplo, Boehringer. De esta manera, resultará evidente para el experto en la materia que una diversidad de metodologías, incluyendo, aunque sin limitarse a las anteriormente indicadas, son bien conocidas de la técnica y pueden resultar útiles en los métodos diagnósticos de la invención.

30 Panel MG- α 2/AH/YKL-40

35 También se da a conocer un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la detección de MG- α 2 en una muestra, la detección de AH en una muestra, la detección de YKL-40 en una muestra, y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basado en la presencia o nivel de MG- α 2, AH y YKL-40. El método puede resultar útil, por ejemplo, para diferenciar una fibrosis hepática leve o la inexistencia de la misma (F0-F1), de la fibrosis hepática moderada a severa (F2-F4).

40 Se da a conocer un método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo mediante la determinación del nivel de proteína MG- α 2 en una muestra del individuo; la determinación del nivel de AH en una muestra del individuo, la determinación del nivel de proteína YKL-40 en una muestra del individuo y el diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en el individuo basándose en los niveles de proteína

MG- α 2, AH y proteína YKL-40. Si se desea, puede determinarse cada uno de los niveles de proteína MG- α 2, AH y proteína YKL-40 utilizando un ensayo ligado a enzima.

5 De esta manera, se dan a conocer métodos diagnósticos que se basan, en parte, en la determinación de un nivel del
 10 marcador fibrótico YKL-40 en una muestra. YKL-40, también conocido como glucoproteína-39 de cartílago humano
 (gp-39 CH) obtiene su nombre de que presenta un peso molecular de 40 kDa y de la secuencia aminoterminal de la
 proteína, de tirosina-lisina-leucina (YKL). Esta glucoproteína, un miembro de mamífero de la familia de la quitinasa
 (18-glucosilhidrolasasa) es una lectina que se une a la heparina y a la quitina y que es producida por los condrocitos,
 15 las células sinoviales, los macrófagos activados, los neutrófilos y las células de osteosarcoma MG-63 (Hakala *et al.*,
 J. Biol. Chem. 268:25803-15810, 1993; Nyirkos y Golds, Biochem. J. 268:265-268, 1990; Renkema *et al.*, Eur. J.
 Biochem. 251:504-509, 1998; Volck *et al.*, Proc. Assoc. Am. Physicians 110:351-360, 1998, y Johansen *et al.*, J.
 Bone Miner. Res. 7:501-511, 1992). El patrón de expresión de YKL-40 en el tejido normal y enfermo indica que esta
 glucoproteína puede funcionar en el remodelado de la matriz extracelular o en la inflamación del tejido (Nyirkos y
 Golds, *supra*, 1990; Renkema *et al.*, *supra*, 1998, y Verheijden *et al.*, Arthritis Rheum. 40:1115-1125, 1997).
 Además, el ARNm de YKL-40 se expresa en el hígado y los estudios iniciales han demostrado que la expresión de
 YKL-40 se encuentra elevada en pacientes con enfermedad hepática crónica y que los niveles incrementados de
 YKL-40 sérico pueden estar asociados a fibrosis y a fibrogénesis (Johansen *et al.*, Scand. J. Gastroenterol. 32: 582-
 590, 1997, y Johansen, J. Hepatol. 32:911-920, 2000).

20 Los métodos de determinación del nivel de YKL-40 en muestras tales como suero y líquido sinovial son bien
 conocidos de la técnica. Por ejemplo, un radioinmunoensayo para YKL-40 basado en un anticuerpo de conejo
 cultivado contra YKL-40 se describe en Johansen *et al.*, Br. J. Rheumatology 32:949-955, 1993. Además, se
 encuentra disponible comercialmente de Metra Biosystems un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich en un
 25 formato de tiras de pocillos de microlitros. En el ensayo de Metra Biosystems, el fragmento Fab de un anticuerpo
 monoclonal anti-YKL-40 conjugado con biotina se une a estreptavidina en la tira y captura YKL-40 presente en la
 muestra. El antisuero policlonal anti-YKL-40 conjugado con fosfatasa alcalina se une al antígeno YKL-40 capturado y
 la actividad de fosfatasa alcalina se detecta con fosfato de p-nitrofenilo como indicación de la concentración de YKL-
 40. Se entiende que los métodos de la invención pueden ponerse en práctica con dichos ensayos o con otros
 ensayos rutinarios de detección o determinación del nivel de ARN o proteína YKL-40.

30 Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo, pero no limitativo, de la presente invención.

EJEMPLO I

35 PANELES DE MARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO NO INVASIVO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

El presente ejemplo demuestra que pueden combinarse varios marcadores séricos en un panel que resulta útil para
 diferenciar los estadios de fibrosis F2, F3 y F4 de los estadios F0 y F1 en pacientes infectados por VHC.

40 Se seleccionaron aleatoriamente de una biblioteca de suero existente muestras de suero procedentes de 194
 pacientes de VHC positivos para el virus de la hepatitis C según análisis del ARN e inmunoanálisis, y que
 presentaban niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT). Cada uno de los pacientes había sido sometido a
 biopsia del hígado como parte de su régimen de cuidados. Se seleccionaron muestras de pacientes que permitiesen
 45 la comparación con otros marcadores sanguíneos rutinarios y los resultados del examen físico realizados durante el
 tratamiento médico rutinario, incluyendo la carga vírica de VHC.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron que el paciente: 1) presentaba una infección confirmada de hepatitis C
 en el momento de la biopsia del hígado y extracción de suero, 2) había sido sometido a biopsia del hígado como
 parte de su régimen de cuidados médicos independientemente del estudio, y 3) había proporcionado previamente su
 50 consentimiento informado. Los pacientes que no proporcionaron su consentimiento informado o se encontraban en
 prisión fueron excluidos del estudio.

Las puntuaciones de fibrosis (estadio Metavir) de los 194 pacientes se establecieron mediante examen
 histopatológico de un espécimen de biopsia con aguja previamente a la terapia según los criterios indicados en el
 55 grupo cooperativo de estudio The French Metavir Cooperative Study Group, Hepatol. 20:15-20, 1994. Todas las
 puntuaciones Metavir de fibrosis fueron establecidas por el mismo patólogo. Para todos los análisis, las
 puntuaciones Metavir de F0 y F1 se agruparon como fibrosis "ausente/leve", mientras que las puntuaciones de F2,
 F3 y F4 se agruparon como fibrosis "moderada/severa". La prevalencia de la fibrosis en el grupo de 194 pacientes se
 determinó que era del 60% basándose en la proporción de puntuaciones F2-F4 en el grupo, tal como se muestra en
 60 la Tabla 2.

TABLA 2 COMPOSICIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO DE 194 PACIENTES DE VHC

SEGÚN ESTADIO DE FIBROSIS		
Estadio de fibrosis	Número	Total F0-F1 ó F2-F4
F0	38	F0-F1 = 78
F1	40	
F2	40	
F3	39	F2-F4 = 116
F4	37	
Total	194	Prevalencia = 59,8%

Tal como se muestra en la Tabla, anteriormente, el panel de pacientes de VHC incluía 37 muestras con un estadio de fibrosis muy elevado (F4), 39 muestras de pacientes con estadio de fibrosis muy bajo o cero (F0), y 158 muestras de pacientes con estadio de fibrosis F1, F2 ó F3.

5 Se sometieron a ensayo muestras de suero para la presencia de varios marcadores putativos de fibrosis, incluyendo laminina, YKL-40, AH, TIMP-1, PIIINP, colágeno de tipo IV y MG- α 2. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (ver la Tabla 3). Los resultados obtenidos para las 194 muestras analizadas para laminina, YKL-40, AH, TIMP-1, PIIINP, colágeno de tipo IV y MG- α 2 se muestran en la

10 Tabla 4.

TABLA 3 KITS DISPONIBLES COMERCIALMENTE PARA LA DETECCIÓN DE MARCADORES DE FIBROSIS			
Marcador	Fabricante	Tipo de ensayo	Número de catálogo
Laminina	Chemicon Intl. (Temecula, CA)	ELISA	ECM310
YKL-40	Metra Biosystems (Mountain View, CA)	ELISA	8020
HA	Corgenix (Westminster, CO)	ELISA	029001
TIMP-1	Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ)	ELISA	RPN 2611
PIIINP	Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia)	RIA	05903
colágeno de tipo IV	Iatron Laboratories (Tokyo, Japón)	RIA	KCAD1
MG- α 2	Beckman Coulter	Nefelometría	449430

15 TABLE 4
DATOS BRUTOS DE 194 PACIENTES DE vh ANALIZADOS PARA LOS NIVELES DE LAMININA, YKL-40, AH, TIMP-1, PIIINP, COLÁGENO DE TIPO IV Y MG- α 2

ID de muestra	Paciente	Laminina (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)	AH (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	PIIINP (ng/ml)	Col. IV (ng/ml)	MG- α 2 (mg/ml)
100010	B-A	175,244	81,608	15,730	1308,802	2,288	1,737	3,03
100038	P-B	151,888	67,220	9,288	917,104	2,049	2,617	2,01
100044	C-B	187,811	60,757	44,127	1610,690	3,883	3,408	5,03
100059	T-B	232,082	51,002	22,583	1077,343	2,297	1,901	2,29
100069	N-C	285,269	131,726	73,851	2381,222	8,034	2,954	4,05
100077	H-C	268,685	47,709	18,066	1122,818	2,260	3,159	1,75
100090	B-C	263,426	26,370	47,339	1380,182	3,526	2,561	3,30
100127	D-D	279,580	166,113	105,505	1180,879	3,343	2,804	3,54
100167	G-F	274,533	482,708	341,132	2523,637	9,745	5,110	3,98
100175	B-G	266,903	95,808	27,721	1178,105	4,345	3,911	2,67
100178	M-G	211,613	159,040	25,669	1176,718	2,357	3,795	1,93
100182	T-G	246,686	55,391	8,889	1308,815	2,924	2,468	2,86
100198	A-G	226,372	48,441	13,901	1126,962	2,595	0,819	3,03
100209	J-G	288,524	83,925	5,051	1081,470	5,173	0,801	2,73
100229	S-H	253,561	110,020	46,568	1391,433	4,905	4,410	3,12
100238	T-J	229,781	38,076	29,516	1190,567	2,626	3,141	2,68
100245	D-K	279,768	270,250	171,481	2310,561	5,876	4,713	4,01
100247	C-K	244,559	131,482	10,219	1405,454	2,297	1,089	2,50
100250	J-K	262,136	101,729	54,821	1155,963	4,192	2,655	4,04
100252	J-K	260,998	61,366	57,275	1560,856	3,498	7,040	3,24

ES 2 420 757 T3

100253	E-K	292,189	173,917	168,768	1652,033	9,252	7,336	3,59
100254	W-K	288,551	477,560	102,775	1580,756	5,300	4,188	4,01
100271	M-L	278,201	89,900	69,651	1140,761	4,092	4,066	2,94
100276	V-L	257,309	176,112	12,196	1088,369	1,985	4,147	3,57
100284	M-L	224,339	130,263	31,822	1104,885	3,653	2,542	3,14
100290	D-L	199,542	541,552	50,429	1550,943	4,399	6,368	3,40
100294	TRL	281,501	217,328	200,436	2340,630	11,006	7,016	4,20
100301	P-M	285,543	430,475	29,772	1884,061	4,453	3,524	4,26
100313	J-M	301,751	188,062	45,539	1852,125	3,610	4,773	4,22
100323	M-M	223,002	626,140	144,334	2382,232	8,873	8,042	4,09
100334	K-R	173,320	63,317	38,516	1290,231	4,327	4,753	2,46
100339	S-M	184,085	36,125	12,049	1268,153	1,865	2,211	2,39
100340	K-M	206,582	57,496	22,015	974,475	2,315	0,819	2,80
100341	T-M	257,580	76,834	91,748	1492,882	3,976	4,793	3,00
100343	D-M	334,202	140,629	49,322	1098,199	4,092	2,412	3,12
100357	P-M	419,291	27,368	14,971	784,932	4,225	0,801	2,01
100374	K-N	300,366	28,231	36,608	1697,678	5,478	6,690	3,16
100379	T-O	233,496	75,711	26,906	1437,939	2,086	2,437	3,70
100382	C-P	206,796	44,461	6,034	989,007	2,214	4,409	2,14
100397	R-R	223,006	66,474	13,912	981,736	4,091	3,814	3,53
100410	R-S	224,775	36,605	37,499	1152,258	4,592	6,466	3,43
100438	D-Q	228,008	149,349	75,452	1682,636	7,734	7,039	3,89
100451	H-R	248,528	526,840	226,386	1961,029	10,505	7,113	3,36
100453	A-R	225,862	65,956	33,169	1421,632	2,786	3,465	3,79
100454	O-R	220,481	56,892	32,531	1125,960	3,003	7,014	3,68
100456	S-S	241,591	46,274	30,745	1337,355	5,182	2,411	2,81
100466	S-S	210,562	48,605	34,443	1482,475	4,286	4,754	3,27
100470	D-S	229,912	162,039	55,053	1684,159	6,806	3,640	3,10
100485	C-T	229,811	113,523	38,389	1247,547	3,901	3,291	4,11
100486	M-T	265,326	281,257	706,557	2716,589	15,362	11,975	2,82
100505	L-W	229,363	33,843	23,305	1149,367	3,397	2,889	3,29
100519	R-W	204,646	68,632	10,431	845,571	3,852	6,815	2,52
100547	S-G	223,959	75,711	8,257	1000,623	4,286	3,090	2,92
100638	J-P	265,819	264,250	68,361	2095,698	15,945	7,418	4,67
100640	M-V	170,293	93,770	17,728	1200,584	4,755	5,561	3,50
100006	L-A	135,628	75,349	79,430	1354,782	6,612	3,477	3,14
100009	R-A	157,239	72,429	21,947	932,635	2,080	3,050	1,96
100011	A-B	136,197	251,237	149,932	2004,294	7,600	4,853	3,57
100016	E-A	161,133	272,434	186,536	1900,341	9,341	9,071	3,08
100021	E-AV	184,000	537,630	102,420	2456,883	4,863	6,157	3,97
100023	C-B	126,346	194,523	47,976	1540,914	7,000	4,488	3,21
100027	D-B	133,660	75,820	33,912	1519,528	2,966	3,286	3,51
100030	R-B	140,584	50,007	153,135	1219,549	3,237	5,200	1,89
100035	K-B	124,645	37,383	60,934	1214,060	3,582	3,620	2,41
100036	G-B	152,864	87,596	369,681	1305,790	3,163	4,391	2,71
100041	M-B	168,422	42,376	143,372	1502,562	6,667	3,692	3,10
100042	M-B	138,754	211,387	266,568	2899,870	8,233	8,559	3,98
100043	C-B	111,743	30,883	17,447	1168,327	5,488	2,343	2,76
100045	V-B	164,940	241,063	221,249	2010,088	9,097	4,512	3,76
100051	K-B	154,743	222,409	131,122	1600,554	4,863	4,075	3,43

ES 2 420 757 T3

100055	D-B	146,817	110,018	84,447	1827,668	3,188	4,439	5,72
100065	G-B	134,349	72,429	112,148	1455,905	3,353	3,002	4,02
100071	R-C	135,011	74,407	30,352	1485,573	2,820	3,120	3,29
100073	G-C	146,785	63,761	43,312	1530,873	3,027	2,040	< 0,75
100074	L-C	151,514	80,248	49,917	1647,700	5,036	3,286	3,11
100078	R-C	163,144	213,365	45,839	1399,880	3,393	2,297	2,61
100081	A-C	147,915	45,862	56,686	1346,315	4,056	4,707	2,37
100084	G-C	144,665	43,130	116,238	1736,670	5,337	6,702	< 0,75
100091	P-C	171,782	215,249	33,321	1999,807	5,096	3,835	3,75
100093	M-C	133,786	35,499	105,726	1499,707	5,983	5,876	2,85
100099	S-C	174,239	49,159	28,163	1392,574	4,381	5,876	3,18
100100	D-C	181,284	68,095	82,324	1613,489	5,552	5,547	3,71
100103	J-C	151,396	74,849	55,720	1666,282	4,771	3,955	3,57
100104	C-C	128,182	38,890	13,719	1100,784	3,798	5,324	2,21
100106	S-C	170,685	41,811	37,449	1280,697	5,096	4,464	2,52
100107	J-C	103,835	27,397	32,334	1416,481	2,910	3,740	2,57
100108	J-C	148,294	145,629	52,822	1884,389	4,484	3,597	4,62
100115	S-DLT	134,784	108,134	96,415	1597,696	8,860	5,225	3,48
100121	R-D	149,335	74,878	34,109	1759,752	5,912	3,716	4,36
100124	R-D	134,766	130,367	35,486	1569,219	2,489	4,877	1,21
100125	B-D	170,790	67,078	97,770	2245,776	7,261	5,876	3,63
100126	D-D	134,313	117,116	65,560	1970,476	2,775	3,788	3,04
100129	E-D	159,707	60,388	28,962	1651,995	5,195	4,902	3,41
100131	J-D	155,166	119,774	31,852	1579,186	3,015	3,405	2,73
100133	M-D	146,280	24,371	75,729	2098,560	3,225	3,788	1,74
100135	H-E	167,472	41,600	66,767	1369,735	3,200	3,429	4,20
100137	D-E	158,406	25,104	68,740	1346,906	3,828	3,405	2,69
100139	S-E	139,877	38,484	42,708	1388,605	4,215	2,814	4,05
100140	L-E	158,942	30,695	181,056	1585,482	7,476	4,977	3,32
100141	W-E	136,761	185,300	179,774	2045,873	9,097	9,872	2,89
100142	R-E	119,383	62,037	16,170	888,744	3,286	2,673	2,07
100143	D-E	131,717	33,779	29,179	1072,170	2,978	3,144	1,91
100147	D-E	132,426	77,159	35,912	1285,138	3,515	2,696	2,12
100150	D-E	120,207	19,056	155,043	1488,729	2,298	4,196	3,66
100151	D-F	125,885	35,735	51,625	1243,711	3,447	3,525	3,05
100155	C-H	146,728	29,137	54,330	1242,340	4,733	3,573	3,15
100159	M-H	136,303	31,336	106,675	1567,716	4,151	3,525	3,51
100161	JF-F	155,052	1710,890	572,598	1966,460	6,226	4,634	4,27
100163	M-F	153,221	785,420	211,173	2167,501	8,269	5,698	3,57
100175a	B-G	148,403	55,347	130,093	1282,502	5,296	4,537	2,79
100181	M-G	137,986	69,735	31,119	1384,651	2,813	3,097	1,89
100183	D-G	168,842	181,909	58,358	1499,596	3,101	3,405	3,86
100186	M-G	184,148	2258,120	347,854	5271,196	11,670	7,756	3,82
100200	R-G	148,660	158,906	143,510	1939,499	5,530	6,080	4,02
100208	R-G	156,210	94,021	36,624	1379,174	5,339	4,366	< 0,75
100221	ND-H	117,196	38,393	88,913	1375,112	2,610	5,274	3,76
100222	J-H	106,131	34,544	31,603	1054,973	2,580	2,955	3,40
100229a	S-H	125,123	53,139	73,989	1567,731	3,828	3,788	2,78
100237	J-J	140,718	397,625	578,952	1824,407	11,836	6,675	2,46
100268	C-L	155,864	76,151	86,977	2060,140	10,963	6,310	3,66

ES 2 420 757 T3

100270	T-L	176,060	24,738	38,749	1579,990	2,549	2,625	3,35
100278	S-L	153,789	48,840	52,524	1367,051	3,039	3,167	1,91
100279	L-LG	163,352	139,202	39,492	1223,652	2,921	4,099	2,37
100287	R-L	164,414	636,110	232,253	3285,078	14,450	9,448	4,19
100291	MS-L	152,863	197,500	42,925	2144,445	2,180	1,993	3,78
100293	D-L	147,479	104,509	27,209	1559,538	3,151	2,696	1,83
100302	A-M	201,715	1021,070	159,330	3317,515	12,498	8,383	4,83
100306	JT-M	125,203	115,289	83,960	1722,987	3,842	2,413	4,16
100307	D-M	128,095	23,612	10,882	1378,118	3,339	3,382	1,42
100313a	J-McA	164,201	192,417	76,599	1966,287	3,828	5,523	3,89
100315	K-MF	153,427	113,449	112,430	2118,580	3,515	4,561	4,46
100317	M-McM	165,245	94,693	144,632	1611,495	4,588	3,215	1,84
100320	D-M	159,724	782,150	106,161	1581,345	13,215	5,597	2,33
100322	R-M	120,098	39,914	51,444	1443,789	2,809	3,644	3,21
100327	K-R	168,143	194,521	101,231	1738,827	4,295	3,835	4,35
100336	ES -M	165,374	135,711	36,329	1556,071	2,932	2,508	3,49
100347	E-M	173,070	69,889	16,945	1710,951	4,808	3,859	3,29
100348	A-M	207,186	75,06	301,583	1334,475	3,299	4,585	3,36
100350	J-M	154,867	4,418	22,250	1388,371	4,087	3,238	1,60
100358	A-M	140,022	15,549	88,786	1247,147	4,502	4,682	1,57
100365	A-M	96,324	26,329	43,344	1170,887	5,381	2,040	2,12
100367	B-M	161,274	30,273	46,174	1469,088	3,089	2,790	3,59
100388	A-P	230,782	275,681	938,015	4245,175	20,496	9,669	5,98
100395	D-R	125,908	24,226	15,309	1299,599	2,478	4,415	3,52
100397a	R-R	179,186	56,479	100,853	1455,947	9,769	4,172	3,62
100398	C-R	151,391	29,397	11,833	1100,156	2,652	2,932	2,28
100403	L-P	179,196	321,607	350,713	2061,218	8,938	4,977	2,28
100404	ML-P	179,163	1060,240	141,902	2248,495	5,959	4,123	4,07
100414	S-S	184,451	70,941	40,126	1048,761	2,549	3,026	3,18
100424	A-P	158,538	62,439	167,519	1320,841	5,509	5,448	3,88
100443	J-R	112,348	40,703	21,470	1045,054	2,663	5,647	4,34
100450	M-R	186,892	200,744	203,399	1287,107	2,586	4,040	3,77
100472	T-S	127,877	119,759	21,867	797,753	2,787	3,962	1,97
100474	J-S	118,319	55,427	19,699	939,914	2,287	3,524	3,15
100482	J-T	125,011	33,428	39,749	1099,832	5,159	4,386	2,56
100483	J-T	136,978	18,006	33,467	1003,831	2,586	4,485	2,06
100488	M-T	178,106	51,908	123,723	1345,743	4,464	6,053	3,84
100495	J-V	180,283	219,322	93,680	1734,925	8,387	4,064	3,82
100502	D-V	114,380	153,296	22,649	1136,728	2,774	4,757	4,47
100503	J-W	149,928	453,095	92,918	1422,332	5,581	4,114	3,15
100513	M-W	117,649	53,027	100,853	1335,730	5,092	4,757	3,74
100528	D-W	189,040	37,248	26,158	1103,495	4,642	3,215	2,90
100530	M-W	106,100	40,234	20,490	924,291	3,297	3,988	2,29
100534	D-A	135,702	37,357	91,410	1421,072	3,374	3,135	3,26
100539	M-DB	167,910	474,960	104,470	215,8,238	4,957	5,566	3,99
100540	A-B	135,980	54,815	183,589	1881,935	3,068	4,485	3,34
100546	D-F	113,363	75,942	47,682	1207,833	2,633	3,055	1,57
100557	T-L	121,746	58,286	27,704	1297,060	3,842	2,060	1,83
100560	C-N	194,265	142,696	91,041	2338,303	6,332	3,267	4,25
100564	D-R	169,241	250,713	65,865	2407,901	5,502	4,534	3,52

100569	J-DC	160,145	64,634	43,744	1349,485	5,962	3,421	3,78
100572	K-K	162,517	260,632	209,581	1729,746	9,292	6,191	2,70
100585	K-Z	171,277	162,336	126,433	2030,404	8,907	4,881	4,71
100594	R-M	119,193	216,295	42,261	1678,540	3,545	3,602	3,26
100603	M-S	119,071	61,460	34,332	1693,071	4,464	4,188	2,92
100611	P-F	178,856	269,956	92,721	896,077	3,960	3,524	3,96
100614	J-McA	204,794	245,159	322,970	3470,966	11,393	6,814	5,32
100617	C-W	159,292	51,343	38,850	1504,544	5,859	4,974	3,60
100630	E-AV	140,072	34,778	59,454	1091,420	1,969	3,161	3,34
100637	R-B	179,987	59,477	137,723	2077,095	4,726	3,002	4,24
101013	T-H	177,189	507,415	237,499	1556,336	9,381	8,910	3,36
101118	G-S	163,553	282,057	150,713	2348,845	6,231	7,161	3,93
101137	S-S	175,291	2049,970	715,601	3318,137	11,450	8,458	3,71
101257	M-F	155,324	40,730	49,441	1082,686	3,240	3,421	1,71
101275	J-C	121,598	143,292	45,227	1454,509	1,915	2,788	4,69
101284	R-F	123,312	16,825	42,048	1072,891	4,386	3,679	1,64
101321	H-P	180,159	180,091	367,681	2235,931	11,450	10,045	3,37
101322	A-P	133,640	269,262	244,520	2015,508	9,119	8,458	4,01
101335	L-S	164,947	64,238	208,719	2545,531	11,018	6,930	3,90
101336	L-S	156,847	741,300	72,664	1387,281	6,097	4,683	3,73
101351	P-F	128,701	12,461	99,050	1557,519	5,486	4,161	4,01
101441	R-H	104,993	176,909	354,512	1338,637	5,271	6,445	3,50
101478	G-S	142,642	63,543	149,266	1296,972	3,859	4,411	2,64
101565	D-A	132,117	74,355	187,250	1206,734	5,962	4,782	2,92

5 Se analizaron parámetros de rendimiento clínico para las combinaciones de marcadores que mejor podían diferenciar la presencia de fibrosis significativa (F2-F4) de la ausencia de fibrosis/fibrosis leve (F0-F1) utilizando diversos algoritmos estadísticos. Entre los algoritmos estadísticos analizados se incluyeron el análisis univariante, las curvas características del receptor-operador (ROC), la regresión logística, el análisis de función discriminante y la optimización del diseño factorial.

10 Los resultados del análisis ROC se muestran en la Tabla 5. Los valores del área bajo la curva (AUC) representan el valor diagnóstico relativo de un único marcador en el valor de corte indicado. Tal como puede observarse por los valores de AUC decrecientes, se demuestra que AH presenta el mejor valor diagnóstico al utilizarse solo en el valor de corte indicado, seguido de PIIINP, TIMP-1, MG- α 2 y colágeno de tipo IV.

	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Valor de corte
AH	0,821	90,0%	62,0%	35,5 ng/ml
PIIINP	0,777	90,8%	39,2%	3,0 ng/ml
TIMP-1	0,773	90,8%	43,0%	1190,6 ng/ml
Macroglobulina- α 2	0,722	90,5%	34,6%	2,4 mg/ml
Colágeno de tipo IV-7S	0,726	90,8%	24,1%	2,79 ng/ml
YKL-40	0,696	90,8%	19,0%	34,5 ng/ml
Laminina	0,524	90,7%	16,5%	125,2 ng/ml

15 Los parámetros de rendimiento clínico para diversas combinaciones de marcadores de fibrosis se muestran en la Tabla 6. Los mejores subconjuntos, incluyendo marcadores individuales, así como combinaciones de dos a cuatro marcadores y algoritmos para discriminar F0F1 de F2F4, se generaron mediante regresión logística. Entre los marcadores se incluían PIIINP, MG- α 2, laminina y colágeno de tipo IV. Tal como se muestra en la Tabla 5, los parámetros de rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) fueron similares para las combinaciones de dos, tres y cuatro marcadores identificados mediante regresión logística en la población de estudio, que presentaba una prevalencia de fibrosis de aproximadamente 60% (ver las líneas 2-4 y 6-9).

20 Tal como se muestra en la Tabla 6, línea 5, el análisis de función discriminante por etapas (SAS) resultó en la identificación del subconjunto de 3 marcadores (PIIINP, MG- α 2 y laminina). El rendimiento clínico de esta

combinación fue similar al de las combinaciones de marcadores identificadas utilizando la regresión logística.

5 Se utilizó el software de diseño de experimentos (DOE KISS, compilación 8, Air Academy Associates) para optimizar simultáneamente los valores de corte de múltiples variables con el fin de obtener el mejor rendimiento del panel de ensayos en la predicción de la fibrosis. Mediante la utilización de DOE KISS, se generó un diseño compuesto central asistido por ordenador para una combinación de marcadores; esta matriz de diseño consistía de una serie de combinaciones de valores de corte para cada uno de los marcadores en la combinación. Los resultados de estos experimentos (sensibilidad, especificidad y exactitud) para diferenciar la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4 se registraron en la hoja de diseño en el ADE. Se llevó a cabo un análisis de regresión para cada uno de los parámetros (sensibilidad, especificidad y precisión), proporcionando valores de corte para cada una de las variables en la combinación, con el fin de conseguir el máximo rendimiento para cada parámetro.

15 Los cinco marcadores con el mejor rendimiento diagnóstico en el análisis ROC (AUC más alta) fueron AH, PIIINP, TIMP-1, MG- α 2 y colágeno de tipo IV (ver la Tabla 5). Los valores de corte de cada uno de los marcadores en este panel de 5 marcadores se optimizaron para la máxima precisión. Los resultados mostrados en la Tabla 6, línea 10, indican que, a la precisión óptima (69,6%), la especificidad era excesivamente baja para resultar útil (32,9%), mientras que la sensibilidad era elevada (94,8%). Se obtuvieron resultados similares al optimizar los marcadores para sensibilidad o especificidad. El análisis de regresión mostró que TIMP-1 no presentaba un efecto significativo sobre la precisión, la sensibilidad o la especificidad de este panel de 5 marcadores.

20 Se analizó un panel similar de 4 marcadores mediante ADE, tal como se muestra en la Tabla 6, línea 11. Al excluir TIMP-1, el panel de cuatro marcadores fue optimizado para precisión (77,8%), proporcionando una sensibilidad y especificidad de 79,1% y 79,5%, respectivamente. Estos resultados demuestran que el panel de cuatro marcadores: AH, PIIINP, MG- α 2 y colágeno de tipo IV, podía diferenciar mejor la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4 que un panel de cinco marcadores constituido por AH, PIIINP, MG- α 2, colágeno de tipo IV y TIMP-1.

30 También se analizaron mediante ADE varios subconjuntos de tres marcadores del panel de cuatro marcadores. La línea 12 muestra los resultados obtenidos para la combinación de AH, colágeno y MG- α 2, con los resultados optimizados para precisión. Este panel de tres marcadores proporcionó una especificidad muy baja, inferior al 30%. En contraste, al optimizar para la precisión un panel de tres marcadores constituido por AH, PIIINP y MG- α 2, se observó que el rendimiento era similar al del panel de cuatro marcadores (comparar las líneas 13 y 11 de la Tabla 6).

35 Un análisis similar del panel de dos marcadores, AH y MG- α 2, proporcionó los resultados mostrados en la línea 14 de la Tabla 6. Esta combinación proporcionó una mejora de la especificidad respecto al panel de tres marcadores, AH, PIIINP y MG- α 2 (84,4% en comparación con 78,3%).

TABLA 6

RENDIMIENTO DE DIVERSOS PANELES DE MARCADORES

Marcadores	Método/Modelo	Sens.	Espec.	Prevalencia 59,3%			Prevalence 20%	
				VPP	VPN	Prec.	PPV	NPV
1	AH	64,96%	82,05%	84,44%	60,95%	47,50%	90,35%	78,63%
2	PIIINP	74,36%	58,97%	73,11%	60,53%	31,18%	90,20%	62,05%
3	PIIINP, AMG	80,53%	63,63%	76,86%	68,54%	31,18%	90,20%	62,05%
4	PIIINP, AMG, Laminina	78,76%	67,53%	78,44%	67,95%	37,75%	92,71%	69,78%
5	PIIINP, AMG, Laminina	78,76%	67,53%	78,44%	67,95%	37,75%	92,71%	69,78%
6	PIIINP, AMG, Laminina	78,76%	64,94%	77,11%	67,09%	35,96%	92,44%	67,70%
7	PIIINP, AMG, laminina, YKL-40	77,87%	67,53%	78,25%	67,05%	37,48%	92,43%	69,60%
8	PIIINP, AMG, Col. IV, YKL-40	78,76%	70,13%	79,82%	68,76%	39,73%	92,96%	71,86%
9	PIIINP, AMG, TIMP-1	78,76%	64,94%	77,11%	67,09%	35,96%	92,44%	67,70%
10	AH, PIIINP, AMG, Col. IV, TIMP-1	94,78%	32,91%	67,28%	81,25%	26,1%	96,2%	45,3%
11	AH, PIIINP, Col. IV, AMG	79,13%	75,95%	82,73%	71,43%	45,13%	93,57%	76,59%
12	AH, Col. IV, AMG	95,65%	29,11%	66,27%	82,14%	25,2%	96,4%	42,4%
13	AH, PIIINP, AMG	78,26%	75,95%	82,57%	70,59%	44,86%	93,32%	76,41%
14	AH, AMG (B)	84,35%	73,42%	82,20%	76,32%	44,24%	94,94%	75,60%
15	TIMP-1, AH, AMG	83,48%	75,95%	83,48%	75,95%	46,46%	94,84%	77,46%
16	YKL-40, AH, AMG	82,61%	75,95%	83,33%	75,00%	46,20%	94,59%	77,28%
17	AH reflejo con Col. IV y AMG	86,32%	70,52%	81,45%	77,46%	42,26%	95,38%	73,68%

5 TIMP-1, la cual se observó que era un buen discriminador de fibrosis en el análisis univariante, fue añadido al panel de dos marcadores. Tal como se muestra en la línea 15, el rendimiento del panel de tres marcadores AH, MG- α 2 y TIMP-1 fue similar al obtenido con el panel de dos marcadores, y se mejoró la sensibilidad en comparación con el panel de tres marcadores AH/PIIINP/MG- α 2 (sensibilidad de 83,5% en comparación con 78,3%). Además, en el análisis preliminar de regresión, TIMP-1 contribuyó significativamente a la discriminación de la fibrosis en una población de estudio con una prevalencia elevada de fibrosis severa.

10 Otro panel de tres marcadores constituido por AH, MG- α 2 y YKL-40 también se optimizó para precisión en la diferenciación de la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4. Tal como se muestra en la Tabla 6, línea 16, este panel de tres marcadores presentó un rendimiento similar al panel MG- α 2/AH/TIMP-1.

15 En resumen, estos resultados indican que un panel MG- α 2/AH/TIMP-1 ó MG- α 2/AH/YKL-40 puede resultar útil en la diferenciación de la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4.

EJEMPLO II

ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN PARA EL ANÁLISIS DEL PANEL DE TRES MARCADORES MG- α 2/AH/TIMP

20 El presente ejemplo describe la utilización de múltiples valores de corte para MG- α 2, AH y TIMP-1 para conseguir un grado relativamente elevado de precisión en un subconjunto de una población total de pacientes sometida a ensayo.

25 Mediante la utilización del panel de tres marcadores MG- α 2/AH/TIMP-1 con valores de corte para MG- α 2, AH y TIMP-1 fijados en 35 ng/ml, 2 mg/ml y 1.000 ng/ml, respectivamente, se determinó que las muestras eran positivas en el caso de que las tres variables presentasen valores superiores a los valores de corte, y por lo tanto se consideraron negativas en el caso de que uno o más de los niveles de MG- α 2, AH o TIMP-1 fuera inferior al valor de corte asignado. Tal como se muestra en la Tabla 7, en la población de 194 pacientes, se observó un total de 72 resultados negativos, 15 de los cuales eran falsos negativos, proporcionando un valor predictivo negativo (VPN) de 79% en la prevalencia de estudio de aproximadamente 60% de fibrosis. A una prevalencia de 30%, que es la típica prevalencia en una clínica de hepatología, el valor predictivo negativo es superior al 92%, lo que resulta útil en el descarte de la presencia de fibrosis F2-F4 (cociente de probabilidades: 0,22).

35 Además, de los 122 positivos del ensayo utilizando los valores de corte de 35 ng/ml, 2 mg/ml y 1.000 ng/ml, 21 de los positivos del ensayo eran falsos, proporcionando un valor predictivo positivo (VPP) de 82,8%. Sin embargo, a una prevalencia más típica de 30% de fibrosis, el valor predictivo positivo cae hasta aproximadamente 58% (ver la Tabla 7). De esta manera, en una población con una prevalencia típica, un resultado positivo no presentaría suficiente valor predictivo para resultar útil como diagnóstico.

40 Con el fin de incrementar el valor predictivo positivo para por lo menos un subconjunto de la población total de pacientes, se evaluaron para positividad de los tres marcadores las muestras positivas según el análisis primario, utilizando un segundo juego de valores de corte que eran superiores a los del primer juego. Mediante la evaluación de aquellas muestras que eran positivas según un análisis primario con los valores de corte más altos, pueden determinarse cuáles son las muestras de fibrosis severa en este grupo con un valor predictivo relativamente elevado. Aquellas muestras con resultado negativo según la evaluación secundaria se consideraron "indeterminadas" en el sentido de que su estatus de fibrosis no podía determinarse con un buen valor predictivo.

TABLA 7											
RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG-a2/AH/TIMP-1 CON ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN EN POBLACIONES CON DIVERSAS PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD											
Optimización para sensibilidad para descartar la fibrosis X1=2,0 mg/ml para MG-a2 Y1=35,00 ng/ml para AH Z1=1000,00 ng/ml para TIMP-1											
	Prevalencia 0,598		0,30		0,200		0,10				
	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Prevalencia	Fib +	Fib -
Ensayo +	101	21	122	188	450	174	215	390	87	242	329
Ensayo -	15	57	72	39	512	550	26	585	610	13	658
Sens.	116	78	194	300	700	1000	200	800	1000	100	1000
Espec.	87,07%	LR+	3,23	87,07%	LR+	3,23	87,07%	LR	0,18	73,08%	LR-
VPP	73,08%	LR-	0,18	73,08%	LR-	0,18	44,71%	+	26,43%	98,07%	0,18
VPN	82,79%			58,09%			95,76%	LR-			
Precisión	79,17%			92,95%			77,27%				
	81,44%			75,88%							74,48%

TABLA 7											
RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG-a2/AH/TIMP-1 CON ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN EN POBLACIONES CON DIVERSAS PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD											
Optimización para especificidad para considerar fibrosis X1=2,0 mg/ml para MG-a2 Y1=60,00 ng/ml para AH Z1=1,575,00 para TIMP-1 ng/ml											
	Prevalencia -0,598		0,30		0,200		0,10				
	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Prevalencia	Fib +	Fib -
Ensayo +	53	1	54	137	9	146	91	10	102	46	57
Ensayo equiv.	48	20	68	124	179	304	83	205	288	41	272
Sens.	101	21	122	261	188	450	174	52,48%	215	390	242
Espec.	52,48%	LR+	11,02	52,48%	LR+	11,0	95,24%	LR+	11,02	52,48%	LR+
VPP	95,24%	LR-	0,50	95,24%	LR-	2	89,91%	LR-	0,50	95,24%	LR-
VPN	98,15%			93,86%			71,25%			79,84%	
Precisión	29,41%			59,11%			76,12%			84,80%	0,50
	59,84%			70,40%						83,93%	

TABLA 7											
RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG-α2/AH/TIMP-1 CON ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN EN POBLACIONES CON DIVERSAS PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD											
Rendimiento final tras doble optimización											
	Prevalencia 0,598		Prevalencia 0,300		Prevalencia 0,200		Prevalencia 0,100				
	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Prevalencia
	53	1	137	9	91	10	46	12	57		
	63	77	163	691	109	790	854	898	54	888	943
	116	78	300	700	200	800	1000	1000	100	900	1000
Sens.	45,69	LR+	45,69%	LR+	45,69	LR+	35,64	LR+	45,69%	LR+	35,64
Espec.	%	LR-	98,72%	LR-	%	LR-	0,55	LR-	98,72%	LR-	0,55
VPP	98,72		93,86%		98,72				79,84%		
VPN	%		80,92%		%				94,24%		
Precisión	98,15		82,81%		89,91				93,42%		
	%				%						
	55,00				87,91						
	%				%						
	67,01				88,11						
	%				%						

TABLA 7											
RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG-α2/AH/TIMP-1 CON ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN EN POBLACIONES CON DIVERSAS PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD											
	Población 194		Población 1000		Población 1000		Población 1000				
	Prevalencia	0,598	0,30	0,200	0,200	0,200	0,100	0,100	Prevalencia	1000	0,100
Falsos negativos	15		39		26		13		Falsos negativos		
Falsos positivos	1		9		10		12		Falsos positivos		
Total incorrectos	16		48		36		24		Total incorrectos		
Total correctos	110	87,3	649	676	676	676	703		Total correctos		
	%										
Segunda ronda											
Fib + Ambiguo	48		124		83		41		Fib + Ambiguo		
Fib - Ambiguo	20	35,1	179	205	205	205	231		Fib - Ambiguo		
Total Ambiguo	68	%	304	288	288	288	272		Total Ambiguo		

TABLA 7									
RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG-g2/AH/TIMP-1 CON ESTRATEGIA DE DOBLE OPTIMIZACIÓN EN POBLACIONES CON DIVERSAS PREVALENCIAS DE ENFERMEDAD									
Rendimiento final tras doble optimización sin valores ambiguos									
		0,598		0,300		0,200		0,100	
		Prevalencia		Prevalencia		Prevalencia		Prevalencia	
		Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -	Fib +	Fib -
Test +		53	1	137	9	91	10	46	12
Test -		15	72	39	512	26	585	13	658
Sens.		68	126	176	521	117	595	59	669
Espec.		77,94%	45,2	77,94%	LR+	77,94%	LR+	77,94%	LR+
VPP		98,28%	LR -	98,28%	LR-	98,28%	LR-	98,28%	LR-
VPN		98,15%	1	93,86%		89,91%		79,84%	
Precisió		79,17%	0,22	92,95%		95,76%		98,07%	
n		87,30%		93,14%		94,93%		96,64%	
		% de la pobl.		% de la pobl.		% de la pobl.		% de la pobl.	
Test +		27,8%		Test +	14,6%	Test +	10,2%	Test +	5,7%
Test -		37,1%		Test -	55,0%	Test -	61,0%	Test -	67,1%
Equiv		35,1%		Equiv	30,4%	Equiv	28,8%	Equiv	27,2%

La Tabla 7 muestra el rendimiento del ensayo del panel MG- α 2/AH/TIMP-1 con la estrategia de doble optimización. Los valores de corte primarios se fijaron en 2,0 mg/ml, 35 ng/ml y 1.000 ng/ml para conseguir una sensibilidad relativamente elevada en el análisis primario. Cualesquiera muestras que presentase los tres niveles, de MG- α 2, AH y TIMP-1, superiores a los valores de corte asignados se consideraban positivas. Los 122 positivos de ensayo obtenidos mediante el análisis primario se evaluaron nuevamente utilizando 2,0 mg/ml, 60 ng/ml y 1.575 ng/ml como los valores de corte de MG- α 2, AH y TIMP-1 y los criterios de que las muestras debían presentar valores de MG- α 2, AH y TIMP-1 superiores a los valores de corte asignados para ser positivas.

- 5
- 10 Mediante la utilización del segundo juego de valores de corte, se determinó que 54 de los 122 pacientes eran positivos, de los cuales sólo 1 era un falso positivo. El valor predictivo positivo era de 98,2% a una prevalencia de fibrosis de 59,8%, y era de 93,9% a la prevalencia de fibrosis más típica, de 30%. En resumen, de los 194 pacientes, 72 fueron clasificados como negativos y 54 se clasificaron como positivos, mientras que 68 muestras presentaron resultados indeterminados y no pudieron clasificarse definitivamente. Además, al excluir las muestras indeterminadas, el ensayo de tres marcadores presentó un valor predictivo positivo de más de 93% y un valor predictivo negativo próximo a 93% en una población típica que presentaba una prevalencia de fibrosis de 30%.
- 15

La Tabla 8 muestra una comparación entre el rendimiento del panel de tres marcadores MG- α 2/AH/TIMP-1 y el panel de seis marcadores descrito en Poynard *et al.*, Lancet 357:1069, 2001.

20

TABLA 8							
COMPARACIÓN ENTRE EL RENDIMIENTO DEL PANEL DE MG- α 2/AH/TIMP-1 Y EL PANEL DE 6 MARCADORES DE POYNARD <i>ET AL.</i>							
Prometheus				Poynard <i>et al.</i>			
	Biopsia				Biopsia		
	Fib +	Fib			Fib +	Fib	
Ensayo +	53	1	54	Ensayo + (>0,08)	45	5	50
Ensayo	15	57	72	Ensayo - (<0,20)	13	106	119
Ambiguo	48	20	68	Ambiguo	80	90	170
Pop, total	116	78	194	Pop, total	138	201	339
Prevalencia	0,05979			Prevalencia	0,4071		
Sensibilidad	0,7794			Sensibilidad	0,7759		
Especificidad	0,9828			Especificidad	0,9550		
VPP	0,9815			VPP	0,900		
VPN	0,7917			VPN	0,8908		
Precisión	0,8730			Precisión	0,8935		
% Ambiguos	0,03505	68/194		% Ambiguos	0,0515	170/339	
Falsos pos,	1	De 54 de ensayo +	1,85%	Falsos pos,	5	De 50 de ensayo +	10,00%
Falsos neg,	15	de 72 de ensayo -	20,83%	Falsos neg,	13	de 119 de ensayo -	10,92%
	Fib +	Fib			Fib +	Fib	
Ensayo +	186	8	194	Ensayo + (>0,08)	133	15	147
Ensayo -	53	433	486	Ensayo - (<0,20)	38	313	351
Ambiguo	168	152	320	Ambiguo	236	265	501
	407	593	1000	Pop, total	407	593	1000
Prevalencia	0,4071			Prevalencia	0,4071		
Sensibilidad	0,7794			Sensibilidad	0,7759		
Especificidad	0,9828			Especificidad	0,9550		
VPP	0,9607			VPP	0,9000		
VPN	0,8917			VPN	0,8907		
Precisión	0,09113			Precisión	0,8935		
% pos, en ensayo	19,4%			% pos, en ensayo	14,7%		

% neg, en ensayo	48,6%			% neg, en ensayo	35,1%		
% Ambiguos	32,0			% Ambiguos	50,1%		
Falsos pos,	8	De 194 de ensayo +	3,93%	Falsos pos,	15	De 147 de ensayo +	10,00%
Falsos neg,	53	de 486 de ensayo -	10,83%	Falsos neg,	38	de 35 de ensayo -	10,93%
* macroglobulina-α2, globulina-α2, bilirrubina total, globulina-γ, apoA1 y GGT							

5 Estos resultados demuestran que el panel de tres marcadores MG-α2/AH/TIMP-1 puede resultar útil para diferenciar la fibrosis F0-F1 de la fibrosis F2-F4 con muy buena precisión. Estos resultados indican además que un ensayo de combinación de marcadores de fibrosis puede resultar útil para determinar el estatus de fibrosis de una parte de los pacientes sometidos a ensayo con muy buena precisión, mientras que los pacientes restantes son candidatos para biopsia.

EJEMPLO III

10 ENSAYO DE MACROGLOBULINA-α2, ÁCIDO HIALURÓNICO E INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASA-1

A. Cuantificación de la macroglobulina-α2 humana (MG-α2)

15 Se cuantificaron los niveles séricos de macroglobulina-α2 humana utilizando el sistema Beckman Array® 360 de la manera indicada a continuación, con el fin de determinar los niveles de MG-α2 en el intervalo de entre 0,75 y 270 mg/ml.

20 Se utilizó el sistema Beckman Array® 360 para la determinación de las concentraciones de MG-α2. Este sistema utiliza un nefelómetro, que mide la tasa de formación de luz dispersada resultante de una reacción de inmunoprecipitación entre el antígeno MG-α2 en una muestra con el anticuerpo contra la MG-α2 humana. Tras pasar un haz de luz por la solución en una celda de flujo, se detecta la intensidad de la luz dispersada por las partículas macromoleculares formadas de complejos insolubles en suspensión en la solución y es medida por el nefelómetro. El incremento de la dispersión de la luz resultante de la reacción de antígeno-anticuerpo se convierte en una señal de tasa máxima que es proporcional a la concentración de MG-α2 en la muestra. La formación de complejos resultantes y el cambio consecuente de intensidad de la luz dispersada se produce a una tasa que se incrementa gradualmente en un primer momento y que finalmente pasa una tasa máxima de cambio para el componente que se analiza.

30 Se extrajeron muestras de suero de individuos en ayuno y generalmente se separaron físicamente de las células dentro de las 2 primeras horas después del momento de la recolección, tal como se indica en la publicación del NCCLS nº H 18-A. Las muestras no sometidas a ensayo dentro de las primeras 72 horas se almacenaron congeladas a una temperatura de entre -15°C y -20°C. Las muestras congeladas se descongelaron como máximo en una ocasión. Se rechazaron los especímenes hemolizados, altamente lipémicos o turbios para el análisis posterior.

35 Se extrajeron los reactivos del almacenamiento a 4°C y se utilizaron inmediatamente. Se mezclaron tampones y diluyentes por completo mediante inversión antes de añadirlos al instrumento. La preparación, purga y calibración se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante con muestras diluidas 1:36. Generalmente se evitó utilizar muestras relativamente concentradas, tales como muestras no diluidas o diluciones 1:6. Las muestras muy lipémicas se diluyeron 1:2 con diluyente antes de someterlas a ensayo. Se evitaron las partículas de polvo u otras materias particuladas, las cuales pueden resultar en señales de dispersión lumínica extrañas, en la solución de reacción. Antes de someter a ensayo las muestras, se eliminaron cualesquiera burbujas de aire o espuma en los vasos para muestras y botella de reactivo mediante la utilización de una pipeta o punta de pipeta de transferencia desechable para aspirar las burbujas. Se evitó el uso de DTT en el área de trabajo.

45 Se analizaron las muestras para la concentración de MG-α2 de la manera siguiente. Se cargó la rueda de reactivos (rueda izquierda) en el instrumento con antisuero de AMG en el espacio nº 2-. Se cargaron los segmentos de dilución con 150 ml de control o muestra en los pocillos en el lado mayor de los segmentos en forma de abanico. Los segmentos y los vasos de control de dilución inicial/muestra se etiquetaron para su identificación. Se evitaron las burbujas durante la carga de los controles y muestras de suero.

50 Se introdujeron los niveles 1 y 3 (3 gotas) de control de proteína Vigil™ en los vasos 1 y 3, respectivamente. Se introdujo el nivel 2 de control inmunológico Biorad Liquichek™ (150 ml) en el vaso 2. Se añadieron las muestras de paciente (150 ml) a los vasos en secuencia. Los segmentos se introdujeron en la rueda derecha que se inicia en la

posición nº 1. Se colocaron tapas de evaporación sobre las ruedas de reactivos y muestras.

En el menú de la pantalla maestra (MASTER SCREEN), se seleccionó la recuperación de resultados (RESULTS RECALL) (F3) antes de (F4) CLR CUR RUN. Tras volver a la MASTER SCREEN, se seleccionó el programa de muestras (SAMPLE PROGRAM) (F1). Se seleccionó ENTER al aparecer rueda de reactivos nº 1 y en cada número de vaso. Se introdujo el ID de control o el nº de acc. de muestra. Se seleccionó ensayo "2" y se seleccionó guardar vaso (SAVE CUP) (F1) para cada vaso. Se seleccionó Inicio (START) para iniciar el análisis. Al final de la operación, se seleccionó (Y) en respuesta a CLEAR CURRENT RUN & START NEXT RUN (borrar proceso actual e iniciar siguiente proceso).

El aparato Beckman Array[®] 360 proporcionó los resultados en mg/dl utilizando números enteros, en el sistema Pros. El instrumento diluyó rutinariamente 1:36 las muestras. Las muestras de concentración superior a 750 mg/dl fueron sometidas a ensayo a una dilución 1:216 por el instrumento. Las muestras que presentaban una concentración inferior a 75 mg/dl a una dilución 1:36 se informaron como <75 mg/dl. A las diluciones iniciales, el intervalo analítico Beckman era de entre 75 y 750 mg/dl, mientras que el intervalo extendido era de 75-27.000 mg/dl. El intervalo para los individuos normales, verificado en Prometheus Laboratories, era de 103 a 274 mg/dl.

Se llevó a cabo el control de calidad de la manera siguiente. Se utilizaron tres niveles de control: bajo, intermedio y alto. Los controles se encontraban a menos de 2 desviaciones estándares, excepto aquellos procesos aceptados con dos controles a menos de 2 desviaciones estándares y el tercer control, entre 2 y 3 desviaciones estándares. Los controles utilizados eran Beckman Vigil I y III, y Biorad Level II. Se sometieron a ensayo los controles con cada proceso de muestras.

Se calibró el ensayo cada 14 días y también en el caso de que se produjesen cambios en los lotes de reactivos o al producirse un cambio importante en el instrumento. Se confirmó la linealidad cada 6 meses con material de linealidad apropiado. Lo anterior se lleva a cabo para garantizar un rendimiento consistente en el tiempo y para satisfacer las normas estatales y nacionales.

Se llevó a cabo la calibración del ensayo cada 6 meses para certificar la consistencia en el tiempo. Cada 6 meses se evaluó un mínimo de cinco muestras de verificación, incluyendo concentraciones mínima, de punto intermedio y máxima. El coeficiente de variación (CV en %) de los resultados de la muestra de verificación debía ser inferior a 15% para informar de los resultados de las muestras de pacientes.

B. Cuantificación del ácido hialurónico (AH)

Se determinaron los niveles séricos de AH utilizando el kit de ensayo cuantitativo de ácido hialurónico (AH) (nº de catálogo 029001) de Corgenix, esencialmente de la manera siguiente.

Se almacenaron las muestras de suero a -70°C. Se evitaron los ciclos múltiples de congelación/descongelación, con un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación por muestra. Los kits se almacenaron a una temperatura de entre 2°C y 8°C.

Previamente a la utilización, el kit y las muestras de pacientes se equilibraron a la temperatura ambiente (entre 18°C y 28°C). La bolsa de tiras recubiertas también se equilibró a la temperatura ambiente antes de abrir. Se preparó solución de lavado (PBS 0,01 M, pH 7,35 ± 0,1) mediante dilución del concentrado 33X de lavado de PBS con agua destilada y el ajuste del pH de la solución final a pH 7,35 ± 0,1.

Todos los blancos, estándares, controles y muestras se sometieron a ensayo por duplicado. Se incluyó un blanco de agua para la calibración del espectrofotómetro con cada placa y siguió vacío hasta la adición de 200 ml de agua inmediatamente antes de la lectura. Se utilizó tampón de reacción sin muestra de suero para el blanco de reactivo, que representaba la solución de referencia de 0 ng/ml de AH, y se trató de la misma manera que las muestras de pacientes y las soluciones de referencia en las etapas de ensayo posteriores. Se procesaron con cada ensayo tres muestras de pacientes conocidas (baja, intermedia y alta). Además, se sometieron a ensayo soluciones de referencia de 50 ng/ml de AH, 100 ng/ml de AH, 200 ng/ml de AH, 500 ng/ml de AH y 800 ng/ml de AH con cada kit tal como se describe en mayor detalle posteriormente.

Se diluyeron 1:11 soluciones de referencia de AH y muestras de pacientes mediante la adición de 25 ml de solución de referencia o muestra a 250 ml de tampón de reacción y se mezclaron mediante agitación por vórtex suave. Las referencias diluidas, las muestras y los controles se añadieron (100 ml) a cada pocillo. El blanco de agua se dejó vacío. La placa se tapó y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras completar la incubación, se extrajo el contenido de los pocillos mediante aspiración. Las placas se lavaron cuatro veces con solución de lavado 1X, evitando que se secasen las placas entre lavados. La placa se secó vigorosamente sobre toallas de papel con el fin de eliminar el tampón residual tras el último lavado.

Se añadió solución de proteína ligante de AH conjugada con HRP (100 µl) a todos los pocillos excepto el blanco de agua antes de tapar la placa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras completar la incubación, se lavó la placa cuatro veces tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se añadió solución de sustrato (100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno, estabilizado) a cada pocillo excepto al blanco de agua. La placa tapada seguidamente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se guardó la placa en la oscuridad.

Se determinó la DO_{650} del estándar de 800 ng/ml de AH. Con una DO inferior a 0,500, se continuó la incubación del sustrato y se realizó un seguimiento de la DO para determinar si la DO había alcanzado 0,500. Con una DO superior a 0,500 ó después de una hora de incubación del sustrato, incluso si la DO no había alcanzado 0,500, se terminaron las reacciones mediante la adición de 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo, excepto al blanco de agua. Se añadió solución de parada en el mismo orden y a aproximadamente la misma tasa que la adición de solución de sustrato. Antes de la lectura de las densidades óptimas, se añadieron 200 µl de agua destilada al blanco de agua. Se leyó la DO de cada pocillo a 450 nm (referencia: 650 nm) dentro de la hora posterior a la calibración a cero del lector de placas con el blanco de agua.

Se utilizaron los criterios siguientes para determinar si el ensayo era fiable. El valor medio de DO del blanco de reactivo (estándar cero) era inferior a 0,10. Las lecturas superiores a 0,10 se consideraron indicativas de posible contaminación de sustrato o reactivo y los resultados no se informaron bajo estas condiciones. El valor medio de DO de la referencia de 500 ng/ml de AH era de 0,800 ó superior. Los controles de las tres muestras de pacientes conocidas se encontraban comprendidas dentro de los intervalos siguientes: Control inferior: 78,6 a 117,2 ng/ml. Control intermedio: 148,5 a 214,1 ng/ml. Control superior: 297,8 a 460,7 ng/ml. Las muestras con concentraciones de AH superiores a 800 ng/ml se diluyeron adicionalmente y se sometieron a ensayo una segunda vez con el fin de obtener un resultado más preciso.

Los controles y muestras de pacientes conocidos se determinaron a partir de una curva estándar de 4 parámetros generada utilizando Softmax y se informan en ng/ml. Los valores de los pacientes no se informaron en el caso de que la concentración excediese la concentración del estándar más alto. Para valores de los pacientes superiores a la concentración del estándar más alto a una dilución 1:11, las muestras se sometieron a ensayo a una dilución 1:55 y, en caso necesario, a una dilución más alta.

El ensayo ELISA del AH se evaluó cada seis meses para garantizar un rendimiento consistente en el tiempo. Se evaluó un mínimo de cinco muestras con valores de AH previamente conocidos en modo ciego para el operador. Para que el rendimiento del ensayo se considerase aceptable, los resultados de las muestras negativas debían ser negativos, y los resultados de las muestras positivas debían ser positivos y proporcionar resultados dentro del 15% de los valores obtenidos previamente. En el caso de que más de 20% de las muestras de validación no cumpliera los criterios de rendimiento, se ponía en práctica el modo de resolución de problemas y no se utilizaba el ensayo para informar los datos de los pacientes hasta establecer nuevamente un rendimiento aceptable del ensayo.

C. Cuantificación del inhibidor tisular de las metaloproteinasa-1 (TIMP-1)

Se determinaron los niveles séricos de TIMP-1 utilizando el kit de ensayo Biotrak™ (nº de catálogo RPN2611) de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), esencialmente de la manera siguiente.

Se descongeló el contenido del kit y se equilibró a una temperatura de entre 20°C y 25°C. Las muestras de suero se almacenaron congeladas a -70°C. Se minimizaron los ciclos repetidos de congelación-descongelación de las muestras, con un máximo de seis ciclos de congelación-descongelación.

Se prepararon reactivos de ensayo de la manera siguiente y se almacenaron a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante como máximo 7 días. Se preparó tampón de ensayo (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, con cloruro sódico al 0,9% (p/v), BSA al 0,1% (p/v) y Tween-20 al 0,1%) mediante la adición de agua destilada al concentrado de tampón de ensayo y ajustando el volumen final a 100 µl.

Se preparó conjugado de anti-TIMP-1 con peroxidasa de rábano picante en tampón de ensayo 1 esencialmente de la manera siguiente. A la botella de solución madre que contenía conjugado liofilizado, se añadieron 11 µl de tampón de ensayo 1 diluido; se mezcló suavemente el contenido hasta la disolución completa, evitando la agitación vigorosa y la formación de espuma. Se preparó tampón de lavado (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía Tween-20 al 0,05%) mediante la adición de agua destilada al concentrado de tampón de lavado y llevando el volumen final a 500 µl, seguido de la mezcla completa.

La solución madre de 100 ng/ml de TIMP-1 se preparó de la manera siguiente y se almacenó a una temperatura de entre 2°C y 8°C. El estándar de TIMP-1 liofilizado se reconstituyó en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía

5 cloruro sódico al 0,9% (p/v), albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) y Tween-20 al 0,1%, preparando una solución madre estándar de TIMP-1 de 100 ng/ml. Se mezcló suavemente el contenido hasta la disolución completa evitando la agitación vigorosa y la formación de espuma. Se prepararon estándares adicionales (1,565, 3,13, 6,25, 12,5, 25 y 50 ng/ml) para la curva de estándares inmediatamente antes de cada ensayo mediante la dilución en serie de dos veces de la solución madre de 100 ng/ml en el tampón de ensayo 1 en tubos de dilución de 1,2 ml. Se preparó además un estándar cero (blanco).

10 La bolsa que contenía la placa de microtitulación se abrió tras el equilibrado a la temperatura ambiente. Todas las muestras y estándares se sometieron a ensayo por duplicado y los estándares para una curva de estándares se encontraban presentes en cada placa. En cada placa, se encontraban presentes siete estándares, dos controles y un máximo de 39 muestras diferentes por duplicado.

15 Las muestras se diluyeron 1:120 en los tubos mediante la mezcla de 595 ml de tampón ensayo 1 con 5 ml de suero. Las diluciones se mezclaron mediante agitación con vórtex. Mediante la utilización de un pipeteador multicanal, se añadieron 100 µl de blanco, estándares y muestras diluidas a los pocillos individuales en una placa de microtitulación. Se tapó la placa con la tapa proporcionada y se incubó a temperatura ambiente durante exactamente dos horas. Tras la incubación de dos horas, se aspiró el contenido de los pocillos y se lavó cada pocillo cuatro veces con tampón de lavado, con rellenado y aspirado completos de los pocillos tras cada lavado. Tras el lavado final, las placas se secaron sobre toallas de papel para eliminar el tampón de lavado residual.

20 Se añadió conjugado de peroxidasas (100 µl) a cada pocillo utilizando un pipeteador multicanal y la placa tapada se incubó a temperatura ambiente durante exactamente dos horas. Tras la incubación, se aspiraron los pocillos y se lavaron tal como anteriormente. Inmediatamente después de acabar la incubación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato TMB equilibrado a temperatura ambiente (3,3',5,5'-tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v)). Se taparon las placas y se incubaron durante exactamente 30 minutos a temperatura ambiente. En algunos casos, se realizó un seguimiento de las reacciones a 630 nm. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M a todos los pocillos. Se determinó la absorbancia a 450 nm en 30 minutos.

30 Se determinaron los valores de las muestras de control y de los pacientes utilizando una curva de estándares (ajuste a la curva de 4 parámetros) generada utilizando Softmax. Los valores de concentración de la curva de estándares se multiplicaron por el factor de dilución (120) con el fin de obtener las concentraciones, expresadas en ng/ml. Se confirmó la calidad del ensayo utilizando muestras de suero conocidas. El control inferior se encontraba comprendido en el intervalo de entre 668,1 y 979,9 ng/ml. El control superior se encontraba comprendido en el intervalo de entre 2.677,9 y 3.300,2 ng/ml. Los valores de los pacientes generalmente no excedieron la concentración en ng/ml del estándar más alto. En el caso de que el valor del paciente fuese superior a la concentración del estándar más alto a una dilución 1:120, se informó del resultado como superior en 120 veces a la concentración del estándar más alto.

40 El ensayo ELISA de TIMP-1 se validó cada seis meses para garantizar un rendimiento consistente en el tiempo. Se evaluó un mínimo de cinco muestras con valores previamente conocidos en modo ciego para el operador. Los resultados de las muestras negativas debían ser negativos. Los resultados de las muestras positivas debían ser positivos y debían proporcionar resultados dentro del 15% de los valores previamente obtenidos. En el caso de que más de 20% de las muestras de validación no cumpliera los criterios de rendimiento, se puso en práctica el modo de resolución de problemas. No se informó de datos adicionales de los pacientes hasta establecer nuevamente un rendimiento aceptable del ensayo.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Prometheus Laboratories, Inc.
Rose, Steven L.
Oh, Esther H.
Walsh, Michael J.

55 <120> Métodos de diagnóstico de la fibrosis hepática

<130> FP-PM 5505

<150> US 10/087,188

60 <151> 2002-02-28

<160> 4

ES 2 420 757 T3

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 2041

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(1932)

<400> 1

```

ccc gcc ttc cta gct gtc cca gtg gag aag gaa caa gcg cct cac tgc 48
Pro Ala Phe Leu Ala Val Pro Val Glu Lys Glu Gln Ala Pro His Cys
1 5 10 15

atc tgt gca aac ggg cgg caa act gtg tcc tgg gca gta acc cca aag 96
Ile Cys Ala Asn Gly Arg Gln Thr Val Ser Trp Ala Val Thr Pro Lys
20 25 30

tca tta gga aat gtg aat ttc act gtg agc gca gag gca cta gag tct 144
Ser Leu Gly Asn Val Asn Phe Thr Val Ser Ala Glu Ala Leu Glu Ser
35 40 45

caa gag ctg tgt ggg act gag gtg cct tca gtt cct gaa cac gga agg 192
Gln Glu Leu Cys Gly Thr Glu Val Pro Ser Val Pro Glu His Gly Arg
50 55 60

aaa gac aca gtc atc aag cct ctg ttg gtt gaa cct gaa gga cta gag 240
Lys Asp Thr Val Ile Lys Pro Leu Leu Val Glu Pro Glu Gly Leu Glu
65 70 75 80

aag gaa aca aca ttc aac tcc cta ctt tgt cca tca ggt ggt gag gtt 288
Lys Glu Thr Thr Phe Asn Ser Leu Leu Cys Pro Ser Gly Gly Glu Val
85 90 95

tct gaa gaa tta tcc ctg aaa ctg cca cca aat gtg gta gaa gaa tct 336

```

ES 2 420 757 T3

Ser	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Pro	Pro	Asn	Val	Val	Glu	Glu	Ser		
			100					105					110				
gcc	cga	gct	tct	gtc	tca	gtt	ttg	gga	gac	ata	tta	ggc	tct	gcc	atg	384	
Ala	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Asp	Ile	Leu	Gly	Ser	Ala	Met		
			115				120					125					
caa	aac	aca	caa	aat	ctt	ctc	cag	atg	ccc	tat	ggc	tgt	gga	gag	cag	432	
Gln	Asn	Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Gln	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Gly	Glu	Gln		
			130				135				140						
aat	atg	gtc	ctc	ttt	gct	cct	aac	atc	tat	gta	ctg	gat	tat	cta	aat	480	
Asn	Met	Val	Leu	Phe	Ala	Pro	Asn	Ile	Tyr	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Asn		
145						150				155					160		
gaa	aca	cag	cag	ctt	act	cca	gag	atc	aag	tcc	aag	gcc	att	ggc	tat	528	
Glu	Thr	Gln	Gln	Leu	Thr	Pro	Glu	Ile	Lys	Ser	Lys	Ala	Ile	Gly	Tyr		
				165					170					175			
ctc	aac	act	ggt	tac	cag	aga	cag	ttg	aac	tac	aaa	cac	tat	gat	ggc	576	
Leu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Gln	Arg	Gln	Leu	Asn	Tyr	Lys	His	Tyr	Asp	Gly		
			180					185						190			
tcc	tac	agc	acc	ttt	ggg	gag	cga	tat	ggc	agg	aac	cag	ggc	aac	acc	624	
Ser	Tyr	Ser	Thr	Phe	Gly	Glu	Arg	Tyr	Gly	Arg	Asn	Gln	Gly	Asn	Thr		
			195				200					205					
tgg	ctc	aca	gcc	ttt	gtt	ctg	aag	act	ttt	gcc	caa	gct	cga	gcc	tac	672	
Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Phe	Ala	Gln	Ala	Arg	Ala	Tyr		
			210				215					220					
atc	ttc	atc	gat	gaa	gca	cac	att	acc	caa	gcc	ctc	ata	tgg	ctc	tcc	720	
Ile	Phe	Ile	Asp	Glu	Ala	His	Ile	Thr	Gln	Ala	Leu	Ile	Trp	Leu	Ser		
225					230					235					240		
cag	agg	cag	aag	gac	aat	ggc	tgt	ttc	agg	agc	tct	ggg	tca	ctg	ctc	768	
Gln	Arg	Gln	Lys	Asp	Asn	Gly	Cys	Phe	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu		
				245					250					255			
aac	aat	gcc	ata	aag	gga	gga	gta	gaa	gat	gaa	gtg	acc	ctc	tcc	gcc	816	
Asn	Asn	Ala	Ile	Lys	Gly	Gly	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Ala		
			260					265						270			
tat	atc	acc	atc	gcc	ctt	ctg	gag	att	cct	ctc	aca	gtc	act	cac	cct	864	
Tyr	Ile	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	His	Pro		
			275				280							285			
gtt	gtc	cgc	aat	gcc	ctg	ttt	tgc	ctg	gag	tca	gcc	tgg	aag	aca	gca	912	
Val	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Phe	Cys	Leu	Glu	Ser	Ala	Trp	Lys	Thr	Ala		
			290				295				300						
caa	gaa	ggg	gac	cat	ggc	agc	cat	gta	tat	acc	aaa	gac	ctg	ctg	gcc	960	
Gln	Glu	Gly	Asp	His	Gly	Ser	His	Val	Tyr	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Ala		
305					310					315					320		

ES 2 420 757 T3

tat gct ttt gcc ctg gca ggt aac cag gac aag agg aag gaa gta ctc	1008
Tyr Ala Phe Ala Leu Ala Gly Asn Gln Asp Lys Arg Lys Glu Val Leu	
325 330 335	
aag tca ctt aat gag gaa gct gtg aag aaa gac aac tct gtc cat tgg	1056
Lys Ser Leu Asn Glu Glu Ala Val Lys Lys Asp Asn Ser Val His Trp	
340 345 350	
gag cgc cct cag aaa ccc aag gca cca gtg ggg gat ttt tac gaa ccc	1104
Glu Arg Pro Gln Lys Pro Lys Ala Pro Val Gly Asp Phe Tyr Glu Pro	
355 360 365	
cag gct ccc tct gct gag gtg gag atg aca tcc tat gtg ctc ctc gct	1152
Gln Ala Pro Ser Ala Glu Val Glu Met Thr Ser Tyr Val Leu Leu Ala	
370 375 380	
tat ctc acg gcc cag cca gcc cca acc tcg gag gac ctg acc tct gca	1200
Tyr Leu Thr Ala Gln Pro Ala Pro Thr Ser Glu Asp Leu Thr Ser Ala	
385 390 395 400	
acc aac atc gtg aag tgg atc acg aag cag cag aat gcc cag ggc ggt	1248
Thr Asn Ile Val Lys Trp Ile Thr Lys Gln Gln Asn Ala Gln Gly Gly	
405 410 415	
ttc tcc tcc acc cag gac aca gtg gtg gct ctc cat gct ctg tcc aaa	1296
Phe Ser Ser Thr Gln Asp Thr Val Val Ala Leu His Ala Leu Ser Lys	
420 425 430	
tat gga gca gcc aca ttt acc agg act ggg aag gct gca cag gtg act	1344
Tyr Gly Ala Ala Thr Phe Thr Arg Thr Gly Lys Ala Ala Gln Val Thr	
435 440 445	
atc cag tct tca ggg aca ttt tcc agc aaa ttc caa gtg gac aac aac	1392
Ile Gln Ser Ser Gly Thr Phe Ser Ser Lys Phe Gln Val Asp Asn Asn	
450 455 460	
aac cgc ctg tta ctg cag cag gtc tca ttg cca gag ctg cct ggg gaa	1440
Asn Arg Leu Leu Leu Gln Gln Val Ser Leu Pro Glu Leu Pro Gly Glu	
465 470 475 480	
tac agc atg aaa gtg aca gga gaa gga tgt gtc tac ctc cag aca tcc	1488
Tyr Ser Met Lys Val Thr Gly Glu Gly Cys Val Tyr Leu Gln Thr Ser	
485 490 495	
ttg aaa tac aat att ctc cca gaa aag gaa gag ttc ccc ttt gct tta	1536
Leu Lys Tyr Asn Ile Leu Pro Glu Lys Glu Glu Phe Pro Phe Ala Leu	
500 505 510	
gga gtg cag act ctg cct caa act tgt gat gaa ccc aaa gcc cac acc	1584
Gly Val Gln Thr Leu Pro Gln Thr Cys Asp Glu Pro Lys Ala His Thr	
515 520 525	
agc ttc caa atc tcc cta agt gtc agt tac aca ggg agc cgc tct gcc	1632
Ser Phe Gln Ile Ser Leu Ser Val Ser Tyr Thr Gly Ser Arg Ser Ala	
530 535 540	

ES 2 420 757 T3

```

tcc aac atg gcg atc gtt gat gtg aag atg gtc tct ggc ttc att ccc 1680
Ser Asn Met Ala Ile Val Asp Val Lys Met Val Ser Gly Phe Ile Pro
545                550                555                560

ctg aag cca aca gtg aaa atg ctt gaa aga tct aac cat gtg agc cgg 1728
Leu Lys Pro Thr Val Lys Met Leu Glu Arg Ser Asn His Val Ser Arg
                565                570                575

aca gaa gtc agc agc aac cat gtc ttg att tac ctt gat aag gtg tca 1776
Thr Glu Val Ser Ser Asn His Val Leu Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser
                580                585                590

aat cag aca ctg agc ttg ttc ttc acg gtt ctg caa gat gtc cca gta 1824
Asn Gln Thr Leu Ser Leu Phe Phe Thr Val Leu Gln Asp Val Pro Val
                595                600                605

aga gat ctg aaa cca gcc ata gtg aaa gtc tat gat tac tac gag acg 1872
Arg Asp Leu Lys Pro Ala Ile Val Lys Val Tyr Asp Tyr Tyr Glu Thr
        610                615                620

gat gag ttt gca att gct gag tac aat gct cct tgc agc aaa gat ctt 1920
Asp Glu Phe Ala Ile Ala Glu Tyr Asn Ala Pro Cys Ser Lys Asp Leu
625                630                635                640

gga aat gct tga agaccacaag gctgaaaagt gctttgctgg agtctctgttc 1972
Gly Asn Ala *

tcagagctcc acagaagaca cgtgtttttg tatctttaa gacttgatga ataaacactt 2032
tttctggtc                2041

```

<210> 2
 <211> 643
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

10

130						135						140			
Asn	Met	Val	Leu	Phe	Ala	Pro	Asn	Ile	Tyr	Val	Leu	Asp	Tyr	Leu	Asn
145					150					155					160
Glu	Thr	Gln	Gln	Leu	Thr	Pro	Glu	Ile	Lys	Ser	Lys	Ala	Ile	Gly	Tyr
				165					170					175	
Leu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Gln	Arg	Gln	Leu	Asn	Tyr	Lys	His	Tyr	Asp	Gly
			180					185					190		
Ser	Tyr	Ser	Thr	Phe	Gly	Glu	Arg	Tyr	Gly	Arg	Asn	Gln	Gly	Asn	Thr
	195					200						205			
Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Phe	Ala	Gln	Ala	Arg	Ala	Tyr
	210					215					220				
Ile	Phe	Ile	Asp	Glu	Ala	His	Ile	Thr	Gln	Ala	Leu	Ile	Trp	Leu	Ser
225					230					235					240
Gln	Arg	Gln	Lys	Asp	Asn	Gly	Cys	Phe	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu
				245					250					255	
Asn	Asn	Ala	Ile	Lys	Gly	Gly	Val	Glu	Asp	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Ala
			260					265					270		
Tyr	Ile	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	His	Pro
	275						280					285			
Val	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Phe	Cys	Leu	Glu	Ser	Ala	Trp	Lys	Thr	Ala
	290					295						300			
Gln	Glu	Gly	Asp	His	Gly	Ser	His	Val	Tyr	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Ala
305					310					315					320
Tyr	Ala	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Gln	Asp	Lys	Arg	Lys	Glu	Val	Leu
				325					330					335	
Lys	Ser	Leu	Asn	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Asp	Asn	Ser	Val	His	Trp
		340						345					350		
Glu	Arg	Pro	Gln	Lys	Pro	Lys	Ala	Pro	Val	Gly	Asp	Phe	Tyr	Glu	Pro
		355					360					365			
Gln	Ala	Pro	Ser	Ala	Glu	Val	Glu	Met	Thr	Ser	Tyr	Val	Leu	Leu	Ala
	370					375						380			
Tyr	Leu	Thr	Ala	Gln	Pro	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Leu	Thr	Ser	Ala
385					390					395					400
Thr	Asn	Ile	Val	Lys	Trp	Ile	Thr	Lys	Gln	Gln	Asn	Ala	Gln	Gly	Gly
				405					410					415	
Phe	Ser	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Val	Ala	Leu	His	Ala	Leu	Ser	Lys
			420					425					430		
Tyr	Gly	Ala	Ala	Thr	Phe	Thr	Arg	Thr	Gly	Lys	Ala	Ala	Gln	Val	Thr
	435						440						445		
Ile	Gln	Ser	Ser	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Lys	Phe	Gln	Val	Asp	Asn	Asn
	450					455					460				
Asn	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Gln	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Glu
465					470					475					480
Tyr	Ser	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Glu	Gly	Cys	Val	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ser
				485					490					495	
Leu	Lys	Tyr	Asn	Ile	Leu	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Phe	Pro	Phe	Ala	Leu
			500					505					510		
Gly	Val	Gln	Thr	Leu	Pro	Gln	Thr	Cys	Asp	Glu	Pro	Lys	Ala	His	Thr
	515							520					525		
Ser	Phe	Gln	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala
	530					535						540			
Ser	Asn	Met	Ala	Ile	Val	Asp	Val	Lys	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Ile	Pro
545					550						555				560
Leu	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Met	Leu	Glu	Arg	Ser	Asn	His	Val	Ser	Arg
				565					570					575	

ES 2 420 757 T3

```

Thr Glu Val Ser Ser Asn His Val Leu Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser
      580                585                590
Asn Gln Thr Leu Ser Leu Phe Phe Thr Val Leu Gln Asp Val Pro Val
      595                600                605
Arg Asp Leu Lys Pro Ala Ile Val Lys Val Tyr Asp Tyr Tyr Glu Thr
      610                615                620
Asp Glu Phe Ala Ile Ala Glu Tyr Asn Ala Pro Cys Ser Lys Asp Leu
      625                630                635                640
Gly Asn Ala
    
```

<210> 3
 <211> 782
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (63)... (683)

<400> 3

```

aggggcctta gcgtgccgca tcgccgagat ccagcgccca gagagacacc agagaaccca 60
cc atg gcc ccc ttt gag ccc ctg gct tct ggc atc ctg ttg ttg ctg 107
Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu
      1                5                10                15

tgg ctg ata gcc ccc agc agg gcc tgc acc tgt gtc cca ccc cac cca 155
Trp Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro
      20                25                30

cag acg gcc ttc tgc aat tcc gac ctc gtc atc agg gcc aag ttc gtg 203
Gln Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val
      35                40                45

ggg aca cca gaa gtc aac cag acc acc tta tac cag cgt tat gag atc 251
Gly Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile
      50                55                60

aag atg acc aag atg tat aaa ggg ttc caa gcc tta ggg gat gcc gct 299
Lys Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala
      65                70                75

gac atc cgg ttc gtc tac acc ccc gcc atg gag agt gtc tgc gga tac 347
Asp Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr
      80                85                90                95

ttc cac agg tcc cac aac cgc agc gag gag ttt ctc att gct gga aaa 395
Phe His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys
      100                105                110

ctg cag gat gga ctc ttg cac atc act acc tgc agt ttc gtg gct ccc 443
Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro
      115                120                125
    
```

ES 2 420 757 T3

tgg aac agc ctg agc tta gct cag cgc cgg ggc ttc acc aag acc tac 491
 Trp Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr
 130 135 140

act gtt ggc tgt gag gaa tgc aca gtg ttt ccc tgt tta tcc atc ccc 539
 Thr Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro
 145 150 155

tgc aaa ctg cag agt ggc act cat tgc ttg tgg acg gac cag ctc ctc 587
 Cys Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu
 160 165 170 175

caa ggc tct gaa aag ggc ttc cag tcc cgt cac ctt gcc tgc ctg cct 635
 Gln Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro
 180 185 190

cgg gag cca ggg ctg tgc acc tgg cag tcc ctg cgg tcc cag ata gcc 683
 Arg Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
 195 200 205

tgaatcctgc ccggagtgga actgaagcct gcacagtgtc caccotgttc ccactcccat 743
 ctttcttccg gacaatgaaa taaagagtta ccaccagc 782

<210> 4
 <211> 207
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

10

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

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de la presencia o severidad de la fibrosis hepática en un individuo, que comprende las etapas de:
- 5 (a) detectar macroglobulina- α 2 en una muestra de dicho individuo,
(b) detectar ácido hialurónico (AH) en una muestra de dicho individuo,
(c) detectar inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) en una muestra de dicho individuo, y
10 (d) diagnosticar la presencia o severidad de la fibrosis hepática en dicho individuo basándose en la presencia o nivel de MG- α 2, AH y TIMP-1.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar como máximo tres marcadores de fibrosis.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar en una muestra de dicho individuo por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de: PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 y apoB.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho marcador es YKL-40.
- 20 5. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar en una muestra de dicho individuo dos o más marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de PIIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 y apoB.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo presenta hepatitis vírica.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho individuo se encuentra infectado por virus de la hepatitis C.
- 30 8. Método según la reivindicación 6, en el que dicho individuo se encuentra infectado por virus de la hepatitis B.
9. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo presenta una enfermedad hepática autoinmunitológica.
10. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo presenta una enfermedad hepática alcohólica.
- 35 11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo presenta una enfermedad hepática grasa.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo presenta una enfermedad hepática inducida por medicamentos.
- 40 13. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende determinar el nivel de proteína MG- α 2 en dicha muestra.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, en el que el nivel de proteína MG- α 2 se determina utilizando uno o más agentes de unión específicos de MG- α 2.
15. Método según la reivindicación 14, en el que el nivel de proteína MG- α 2 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-MG- α 2.
- 50 16. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende determinar el nivel de actividad de MG- α 2.
17. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende determinar el nivel de AH en dicha muestra.
18. Método según la reivindicación 17, en el que el nivel de AH se determina utilizando uno o más agentes de unión específicos de AH.
- 55 19. Método según la reivindicación 18, en el que el nivel de AH se determina utilizando uno o más agentes de unión a AH.
- 60 20. Método según la reivindicación 18, en el que el nivel de AH se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-AH.
21. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende determinar el nivel de proteína TIMP-1 en

dicha muestra.

- 5 22. Método según la reivindicación 21, en el que el nivel de proteína TIMP-1 se determina utilizando uno o más agentes de unión específicos de TIMP-1.
23. Método según la reivindicación 22, en el que el nivel de proteína TIMP-1 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-TIMP-1.
- 10 24. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende determinar el nivel de actividad de TIMP-1.
25. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende determinar el nivel de proteína MG- α 2, en el que la etapa (b) comprende determinar el nivel de AH, y en el que la etapa (c) comprende determinar el nivel de proteína TIMP-1.
- 15 26. Método según la reivindicación 25, en el que el nivel de cada uno de proteína MG- α 2, AH y proteína TIMP-1 se determina utilizando un ensayo ligado a enzima.
27. Método según la reivindicación 1, en el que se obtiene una sola muestra de dicho individuo.
- 20 28. Método según la reivindicación 27, en el que dicha muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático.
29. Método según la reivindicación 28, en el que dicha muestra es una muestra de suero.
- 25 30. Método según la reivindicación 1, que comprende diferenciar la fibrosis hepática leve o la ausencia de fibrosis de la fibrosis hepática moderada a severa.
- 30 31. Método de diferenciación de la fibrosis hepática leve o la ausencia de fibrosis de la fibrosis hepática moderada a severa en un individuo, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una dilución apropiada de una muestra de dicho individuo con anticuerpo anti-MG- α 2 bajo condiciones adecuadas para formar un primer complejo de MG- α 2 y anticuerpo anti-MG- α 2,
- (b) lavar dicho primer complejo para eliminar las moléculas no unidas,
- 35 (c) determinar la cantidad de primer complejo que contiene MG- α 2,
- (d) poner en contacto una dilución apropiada de una muestra de dicho individuo con una proteína de unión a AH (PUAH) bajo condiciones adecuadas para formar un segundo complejo de AH y PUAH,
- (e) lavar dicho segundo complejo para eliminar las moléculas no unidas,
- (f) determinar la cantidad de segundo complejo que contiene AH,
- 40 (g) poner en contacto una dilución apropiada de una muestra de dicho individuo con anticuerpo anti-TIMP-1 bajo condiciones adecuadas para formar un tercer complejo de TIMP-1 y anticuerpo anti-TIMP-1,
- (h) lavar dicho tercer complejo para eliminar las moléculas no unidas,
- (i) determinar la cantidad de tercer complejo que contiene TIMP-1, y
- (j) diferenciar la fibrosis hepática leve/ausencia de fibrosis de la fibrosis hepática moderada/severa en dicho individuo basándose en las cantidades de complejos que contienen MG- α 2, AH y TIMP-1.
- 45 32. Método de seguimiento de la eficacia de la terapia antifibrótica en un paciente, que comprende las etapas de:
- (a) detectar macroglobulina- α 2 en una muestra de un paciente en el que se ha administrado una terapia antifibrótica,
- (b) detectar ácido hialurónico (AH) en una muestra de dicho paciente,
- 50 (c) detectar inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) en una muestra de dicho paciente, y
- (d) determinar la presencia o severidad de la fibrosis hepática en dicho paciente basándose en la presencia o nivel de MG- α 2, AH y TIMP-1, realizando un seguimiento de esta manera de la eficacia de la terapia antifibrótica.
33. Método según la reivindicación 32, que comprende además comparar la presencia o la severidad de la fibrosis hepática determinada en la etapa
- 55 (d) con la presencia o severidad de la fibrosis hepática en dicho paciente en un tiempo anterior.
34. Método según la reivindicación 32, que comprende detectar como máximo tres marcadores de fibrosis.
- 60 35. Método según la reivindicación 32, que comprende además detectar en una muestra de dicho paciente por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de: PIINP, laminina, tenascina, colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VI, YKL-40, MMP-3, MMP-2, complejo MMP-9/TIMP-1, ligando sFas, TGF- β 1, IL-10, apoA1, apoA2 y apoB.

36. Método según la reivindicación 32, en el que la etapa (a) comprende determinar el nivel de proteína MG- α 2 en dicha muestra.
- 5 37. Método según la reivindicación 36, en el que el nivel de proteína MG- α 2 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-MG- α 2.
38. Método según la reivindicación 32, en el que la etapa (b) comprende determinar el nivel de AH en dicha muestra.
- 10 39. Método según la reivindicación 38, en el que el nivel de AH se determina utilizando uno o más agentes de unión a AH.
40. Método según la reivindicación 32, en el que la etapa (c) comprende determinar el nivel de proteína TIMP-1 en dicha muestra.
- 15 41. Método según la reivindicación 40, en el que el nivel de proteína TIMP-1 se determina utilizando uno o más anticuerpos anti-TIMP-1.
- 20 42. Método de diferenciación de la fibrosis hepática leve o ausencia de fibrosis de la fibrosis hepática moderada/severa en un individuo, que comprende las etapas de:
- (a) determinar un nivel de MG- α 2 en una muestra de dicho individuo,(b) determinar un nivel de AH en una muestra de dicho individuo,
- 25 (c) determinar un nivel de TIMP-1 en una muestra de dicho individuo, y
- (d) diagnosticar que dicho individuo presenta fibrosis hepática leve/ausencia de fibrosis en el caso de que dicho nivel de MG- α 2 es inferior a un valor de corte de MG- α 2 X1, dicho nivel de AH es inferior al valor de corte de AH Y1 ó dicho nivel de TIMP-1 es inferior al valor de corte Z1 de TIMP-1,
- 30 diagnosticar que dicho individuo presenta fibrosis hepática leve/ausencia de fibrosis en el caso de que dicho nivel de MG- α 2 es superior a un valor de corte de MG- α 2 X2, dicho nivel de AH es superior al valor de corte de AH Y2 y dicho nivel de TIMP-1 es superior al valor de corte Z2 de TIMP-1, y diagnosticar los individuos restantes como de estatus indeterminado.
- 35 43. Método según la reivindicación 42, en el que dicho individuo presenta un trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste de hepatitis vírica, enfermedad hepática autoinmunitaria, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática grasa y enfermedad hepática inducida por medicamentos.
44. Método según la reivindicación 43, en el que dicho individuo se encuentra infectado por virus de la hepatitis C.
- 40 45. Método según la reivindicación 42, en el que dichas muestras se seleccionan de entre el grupo que consiste de sangre, suero, plasma, orina, saliva y tejido hepático.
46. Método según la reivindicación 45, en el que se determinan en una muestra de suero cada uno de dichos niveles de MG- α 2, de AH y de TIMP-1.
- 45 47. Método según la reivindicación 46,
- en el que X1 es un valor entre 1,8 y 2,2 mg/ml,
- en el que Y1 es un valor entre 31 y 39 ng/ml,
- en el que Z1 es un valor entre 900 y 1.100 ng/ml,
- 50 en el que X2 es un valor entre 1,8 y 2,2 mg/ml,
- en el que Y2 es un valor entre 54 y 66 ng/ml, y
- en el que Z2 es un valor entre 1.415 y 1.735 ng/ml.
48. Método según la reivindicación 47,
- 55 en el que X1=2,0 mg/ml,
- en el que Y1=35 ng/ml,
- en el que Z1=1.000 ng/ml,
- en el que Y2=60 ng/ml, y
- en el que Z2=1.575 ng/ml.
- 60 49. Método según la reivindicación 47,
- en el que X1=2,0 mg/ml,
- en el que Y1=37 ng/ml,

en el que $Z1=1.100$ ng/ml,
en el que $X2=2,0$ mg/ml,
en el que $Y2=60$ ng/ml, y
en el que $Z2=1.575$ ng/ml.

- 5
50. Método según la reivindicación 42, en el que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30%, por lo menos 65% de los individuos en dicha población son diagnosticados con fibrosis leve/ausencia de fibrosis o fibrosis moderada/severa con una precisión de por lo menos 80%.
- 10
51. Método según la reivindicación 42, en el que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30%, por lo menos 65% de los individuos en dicha población son diagnosticados con fibrosis leve/ausencia de fibrosis o fibrosis moderada/severa con una precisión de por lo menos 90%.
- 15
52. Método según la reivindicación 42, en el que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 30%, por lo menos 65% de los individuos en dicha población son diagnosticados con fibrosis leve/ausencia de fibrosis o fibrosis moderada/severa con un valor predictivo positivo de por lo menos 90% y un valor predictivo negativo de por lo menos 90%.
- 20
53. Método según la reivindicación 42, en el que, en una población que presenta una prevalencia de fibrosis hepática de hasta 10%, por lo menos 70% de los individuos en dicha población son diagnosticados con fibrosis leve/ausencia de fibrosis o fibrosis moderada/severa con una precisión de por lo menos 90%.

```

1 cccgccttcc tagctgtccc agtggagaag gaacaagcgc ctcaactgcat ctgtgcaaac
61 gggcggcaaa ctgtgtcctg ggcagtaacc ccaaagtcat taggaaatgt gaatttcaact
121 gtgagcgcag aggcactaga gtctcaagag ctgtgtggga ctgaggtgcc ttcagttcct
181 gaacacggaa ggaaagacac agtcatcaag cctctgttgg ttgaacctga aggactagag
241 aaggaaacaa cattcaactc cctactttgt ccatcaggtg gtgaggttcc tgaagaatta
301 tccctgaaac tgccacccaaa tgtggtagaa gaatctgccc gagcttctgt ctcagttttg
361 ggagacatat taggctctgc catgcaaaac acacaaaatc ttctccagat gccctatggc
421 tgtggagagc agaatatggg cctctttgct cctaacatct atgtactgga ttatctaaat
481 gaaacacagc agcttactcc agagatcaag tccaaggcca ttggctatct caacactggg
541 taccagagac agttgaaact caaacactat gatggctcct acagcacctt tggggagcga
601 tatggcagga accagggcaa cacctggctc acagcctttg ttctgaagac ttttgcccaa
661 gctcgagcct acatcttcat cgatgaaagc cacattacc aagcctcat atggctctcc
721 cagaggcaga aggacaatgg ctgtttcagg agctctgggt cactgctcaa caatgccata
781 aagggaggag tagaagatga agtgaccctc tccgcctata tcaccatcgc cottctggag
841 attcctctca cagtactca ccctgttgc cgcaatgccc tgttttgctt ggagtcagcc
901 tggagacag cacaagaagg ggaccatggc agccatgtat ataccaaaga cctgctggcc
961 tatgcttttg ccctggcagg taaccaggac aagaggaagg aagtactcaa gtcacttaat
1021 gaggaagctg tgaagaaaga caactctgtc cattgggagc gcctcagaa acccaaggca
1081 ccagtggggg atttttacga accccaggct ccctctgctg aggtggagat gacatcctat
1141 gtgctcctcg cttatctcac ggcccagcca gccccaacct cggaggacct gacctctga
1201 accaacatcg tgaagtggat cacgaagcag cagaatgccc agggcggtt ctcctccac
1261 caggacacag tgggtgctct ccatgctctg tccaaatag gagcagccac atttaccagg
1321 actgggaagg ctgcacaggt gactatccag tcttcagggc cattttccag caaattccaa
1381 gtggacaaca acaaccgcct gttactgcag caggtctcat tgccagagct gcctggggaa
1441 tacagcatga aagtgacagg agaaggatgt gtctacctcc agacatcctt gaaatacaat
1501 attctcccag aaaaggaaga gttccccctt gctttaggag tgcaactctt gcctcaact
1561 tgtgatgaac ccaaagccca caccagcttc caaatctccc taagtgtcag ttacacaggg
1621 agccgctctg cctccaacat ggcgatcgt gatgtgaaga tggctctg ttcattccc
1681 ctgaagccaa cagtgaaaat gcttgaaaaga tctaaccatg tgagccggac agaagtcagc
1741 agcaaccatg tcttgattta ccttgataag gtgtcaaatc agacactgag cttgttcttc
1801 acggttctgc aagatgtccc agtaagagat ctgaaaccag ccatagtgaa agtctatgat
1861 tactacgaga cggatgagtt tgcaattgct gagtacaatg ctcttgag caaagatctt
1921 ggaaatgctt gaagaccaca aggctgaaaa gtgctttgct ggagtcctgt tctcagagct
1981 ccacagaaga cacgtgtttt tgtatcttta aagacttgat gaataaacac tttttctggt
2041 c

```

A

PAFLAVPVEKEQAPHICANGRQTVSWAVTPKSLGNVNFVSAEALESQELCGTEVPSVPEHGRKDTVIKPL
LVEPEGLEKETTFFNSLLCPGGEVSEELSLKLPNNVVEESARASVSVLGDILGSAMQNTQNLLOMPYCGEQ
NMVLFAPNIYVLDYLNQQLTPEIKSKAIGYLNQYRQLNYKHYDGSYSTFGERYGRNQNTWLTAFVLK
TFAQARAYIFIDEAHITQALIWLSQRQKDNQCFRSSGSLLNNAIKGGVEDEVTL SAYITIALLEIPLTVTHP
VVRNALFCLES AWKTAQEGDHGSHVYTKDLLAYAFALAGNQDKRKEVLKSLNEEAVKKDNSVHWERPQKPKA
PVGDFYEPQAPSAEVE MTSYVLLAYLTAQPAPTSEDLTSATNIVKWI TKQONAQGGFSSTQDTVVALHALSK
YGAATFTRTGKAAQVTIQSSGTFSSKFQVDMNRLLLQQVSLPELPGEYS MKVTGEGCVYLQTS LKYNILPE
KEEPPFALGVQTLPTCDEPKAHTSFQISLSVSYTGSRASNMAI VDKMVS GFIP LKPTVKMLERSNHVSR
TEVSSNHVLIYLDKVS NQTL S LFFTVLQDVPVRDLKPAI VKVYDY YETDEFAIAEYNAPCSKDLGNA

B

FIGURA 1

```

1 aggggcctta gcgtgccgca tgcgcgagat ccagcgccca gagagacacc agagaaccça
61 ccatggcccc ctttgagccc ctggcttctg gcatcctggt gttgctgtgg ctgatagccc
121 ccagcagggc ctgcacctgt gtcccacccc acccacagac ggccttctgc aattccgacc
181 tcgtcatcag ggccaagttc gtggggacac cagaagtcaa ccagaccacc ttataccagc
241 gttatgagat caagatgacc aagatgtata aagggttcca agccttaggg gatgcccgtg
301 acatccggtt cgtctacacc cccgccatgg agagtgtctg cggatacttc cacaggtccc
361 acaaccgcag cgaggagttt ctcatgtctg gaaaactgca ggatggactc ttgacatca
421 ctacctgcag tttcgtggct cctggaaca gctgagctt agctcagcgc cggggcttca
481 ccaagaccta cactgttggc tgtgaggaat gcacagtgtt tcctgttta tccatcccct
541 gcaaaactgca gagtggcact cattgcttgt ggacggacca gctcctcaa ggctctgaaa
601 agggcttcca gtcccgtcac cttgocctgcc tgccctcgga gccagggctg tgcacctggc
661 agtccctgcg gtcccagata gctgaatcc tgcccggagt ggaactgaag cctgcacagt
721 gtccaccctg tcccactcc catctttctt ccggacaatg aaataaagag ttaccacca
781 gc

```

A

MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRACFCVPPHPQTAF CNSDLVIRAKFVGTPEVNQTTLYQRYEIKMTKMY
KGFQALGDAADIRFVYTPAMESVCGYFHRSHNRSEEFLLIAGKLDGLLHITTCSEFVAPWNSLSLAQRRG
FTKTYTVGCEECTVFPCLSI PCKLQSGTHCLWTDQLLQSEKGFQSRHLACLPREPGLCTWQSLRSQIA

B

FIGURA 2