

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 229**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G06F 19/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2005 E 05771179 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1745403**

54 Título: **Método para diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una patología hepática en un sujeto y/o para controlar la eficacia del tratamiento de dicha patología**

30 Prioridad:

14.05.2004 FR 0405306

28.10.2004 FR 0411536

28.10.2004 US 622886 P

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

15.04.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITE D'ANGERS (50.0%)

40, rue de Rennes

49000 Angers, FR y

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

D'ANGERS (50.0%)

72 Inventor/es:

CALES, PAUL

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 455 229 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una patología hepática en un sujeto y/o para controlar la eficacia del tratamiento de dicha patología

5

La presente invención concierne al campo del diagnóstico en hepatología, y específicamente tiene como objeto un método que permita la evaluación de la presencia y/o de la gravedad de la fibrosis hepática del hígado.

10

En el sentido de la de la presente invención, el término « evaluación de la presencia de la fibrosis » significa se investiga si la fibrosis existe o no en el paciente analizado por el método de la invención; el término « evaluación de la gravedad » significa que se investiga una medida del grado de fibrosis, esto debe distinguirse de la gravedad de la enfermedad hepática, que es una deficiencia funcional del hígado. El término « evaluación del área de fibrosis » significa que se investiga una medida del grado de lesión del hígado por la fibrosis. Es claro que el deterioro funcional del hígado está en función del grado de lesión anatómica del hígado, pero no linealmente.

15

La gravedad de las enfermedades crónicas del hígado reside en la fibrosis que es una cicatriz secundaria a la inflamación. Las causas de las enfermedades fibrosantes del hígado son principalmente las infecciones virales B y C, el alcohol y la esteatosis (hígado graso).

20

Hasta el presente, la evaluación de la fibrosis reposa en la biopsia hepática (PBH). La fibrosis hepática se clasifica a partir de la PBH en marcador de fibrosis semicuantitativo. Existen muchas clasificaciones basadas en la observación de lesiones similares. La descripción de esas lesiones es principalmente cualitativa después de una perturbación (o distorsión) de la arquitectura de la unidad elemental (a nivel funcional y anatómico) del hígado que es el « lóbulo » hepático. La fibrosis nace en la periferia del lóbulo en el espacio « puerta » (etapa F1) para extenderse en el lóbulo (bandas restringidas de fibrosis en la etapa F2) y luego disecciona (bandas extensivas de fibrosis o etapa F3) para ser concéntrica y aislar las células hepáticas (etapa F4 o cirrosis). La clasificación Metavir descrita arriba (Bedossa y otros, 1994, Hepatology, vol. 20, páginas 15-20) es una de las más utilizadas. Ella clasifica la fibrosis hepática en 5 etapas de F0 a F4, la etapa F4 corresponde a la última etapa de cirrosis. Se dice que la fibrosis es clínicamente significativa cuando es de etapa $F \geq 2$. E marcador de la fibrosis F se utiliza por todos los especialistas del hígado en el mundo (según clasificaciones diferentes). Es el parámetro más importante para determinar la gravedad de una enfermedad del hígado, su potencial evolutivo y la indicación del tratamiento. Es de una ayuda determinante para poder prescribir un tratamiento o para el cuidado de un enfermo. Esta clasificación en puntuación F es semi-cuantitativa por 3 razones : a) la descripción de las lesiones es puramente cualitativa y por lo tanto evaluada por un médico anatómico-patólogo, b) la gradación sólo se puede hacer con un número finito y restringido de etapas (de 4 a 6 sin contar la ausencia de fibrosis), c) la progresión de la cantidad de fibrosis no es lineal en función de las etapas. El aspecto cuantitativo se debe al carácter ordenado de las clases según la extensión de la fibrosis en el seno del lóbulo.

25

30

35

Existe un medio puramente cuantitativo de medir la fibrosis : es la medición del área (o superficie) de fibrosis por una técnica semi-automática llamada análisis de imagen. Con relación a un panel de marcadores sanguíneos de fibrosis, considerado como referencia, el área de fibrosis demostró ser más fiable que la puntuación de Metavir (Pilette y otros, 1998, J Hepatol, vol. 28, páginas 439-46).

40

Sin embargo, la PBH es un examen costoso e invasivo por lo tanto susceptible de complicaciones y necesita como mínimo una hospitalización de día. Las limitaciones actuales de la PBH (costo, intervención invasiva que necesita una hospitalización) limitan la utilización. Utilizar este método diagnóstico sigue siendo un uso casi exclusivo de los especialistas del hígado. Por lo tanto, la atención médica actual incluye los pacientes que están a menudo en una etapa relativamente avanzada de la enfermedad (cirrosis a menudo complicada), para los cuales las posibilidades de tratamiento son menores.

45

Varias investigaciones demuestran claramente que la PBH es el principal factor limitante de detección y el acceso a los tratamientos. El desarrollo de alternativas a la PBH, que es el objetivo de la presente invención, forma parte de las recomendaciones de investigación de las conferencias de consenso americana y francesa en 2002.

50

La fibrosis hepática, incluyendo cirrosis hasta la etapa reciente, es un estado reversible. La detección precoz de la fibrosis permite a menudo proponer medidas para curar la enfermedad o al menos limitar las consecuencias.

55

Las alternativas a la PBH son los medios no invasivos, en primer lugar los marcadores sanguíneos de fibrosis. El término de marcadores sanguíneos de fibrosis posee de hecho dos significados. Para el biólogo, se trata de marcadores que reflejan uno de los procesos dinámicos de la fibrosis : fibrogénesis (producción de fibrosis), fibrolisis (destrucción de la fibrosis). Para el clínico, se trata de un marcador del grado de fibrosis observada con el examen anatomopatológico (fibrosis « septal » principalmente), es decir una imagen estática resultante de los dos procesos dinámicos precedentes. Además, el clínico distingue esos indicadores en marcadores directos cuando se obtienen a partir de una de las moléculas que participan en la

60

matriz extracelular (fibrosis) y en marcadores indirectos cuando reflejan pero no forman parte integrante de esta fibrosis visible.

5 La Solicitud de Patente Internacional publicada con el número WO 02/16949 describe un método de diagnóstico de enfermedades inflamatorias, fibróticas o cancerosas, en las que se miden los valores de los marcadores bioquímicos en el suero o el plasma de un paciente, se combinan dichos valores gracias a una función lógica, y se analiza el valor final de dicha función lógica en vistas de determinar la presencia de fibrosis o la presencia de lesión necrótico-inflamatorias del hígado. Esta solicitud de patente internacional permite proponer una prueba de fibrosis. Sin embargo, los marcadores utilizados son marcadores bioquímicos clásicos (marcadores indirectos), que no son indicadores específicos de la fibrosis y pueden variar en función de otras perturbaciones presentes en el curso de las enfermedades del hígado. La prueba que existen en el mercado corresponden al método de la patente WO02/16949, (ver también Imbert-Bismut y otros, Lancet 2001, Vol. 37, páginas 1069-1075), llamado el Fibrotest comercializado por la sociedad Biopredictive presenta específicamente el inconveniente de tener dificultades para clasificar correctamente a los pacientes con hepatitis viral de etapa F0 y F4.

15 Además, la solicitud de patente internacional publicada con el número WO03/07382 concierne un método para diagnosticar la presencia o la gravedad de una fibrosis hepática en un paciente. Este método se basa en la detección de tres marcadores que son la α 2-macroglobulina, el ácido hialurónico y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas-1.

20 La presente invención tiene como objeto proponer nuevas herramientas que permitan determinar las etapas de fibrosis F, en particular de puntuación $F \geq 2$, y cuantificar de manera fina el grado exacto de esta fibrosis, en vista de diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una patología hepática, y/o para controlar la eficacia de un tratamiento curativo.

25 El seguimiento de la eficacia de un tratamiento curativo o de suspensión es importante. Como la mayoría de las enfermedades crónicas del hígado se acompañan de una fibrosis, el tratamiento curativo o de suspensión tiene como efecto retardar la progresión o incluso el retroceso de la fibrosis. Por lo tanto es importante poder disponer de pruebas que puedan evaluar esta variación de la fibrosis.

30 Contrario a las herramientas y métodos de la técnica anterior, la presente invención no se refiere solamente a las fibrosis cuya causa es viral, sino también las fibrosis cuya causa es alcohólica y las esteatosis.

Por otro lado, las herramientas de la presente invención son más confiables que las de la técnica anterior.

35 Estas herramientas son un resultado diagnóstico de la presencia y de la gravedad de la fibrosis, también llamadas marcador de diagnóstico de la fibrosis portal y septal.

La invención permite por lo tanto la determinación de un marcador de diagnóstico no invasivo de la fibrosis portal y septal (que se refleja en la puntuación Metavir) y clínicamente significativo. La puntuación de acuerdo con la invención varía de 0 (fibrosis mínima) a 1 (fibrosis máxima) con el umbral de referencia fijado en 0,5 para las puntuaciones de Metavir $F \geq 2$. Esta puntuación se calcula a partir de una referencia subjetiva semicuantitativa de fibrosis: la puntuación Metavir. La puntuación Metavir se determina por un médico anatomopatólogo después del examen de un fragmento de hígado al microscopio. La escala de esta puntuación no invasiva es por lo tanto virtual porque se distorsiona en relación con la medición real (aunque también arbitraria y subjetiva) de fibrosis representada por una puntuación de Metavir de 0 a 4. La escala es virtual porque se genera por una fórmula matemática y no hay una unidad de medida, y esta escala se deforma porque no hay proporcionalidad directa (o lineal) entre las puntuaciones de Metavir y no invasivas. Sin embargo, esta puntuación de 0-1 es una medición más precisa de fibrosis portal y septal, ya que es una variable cuantitativa que permite comparaciones más finas. Dos ejemplos de resultado: un sujeto puede cambiar una puntuación de 0,14 a 0,28 mientras que todavía está en la etapa F0-F1 de Metavir y por tanto duplica su puntuación de fibrosis (progresión de 100% en valor relativo). A la inversa, cuando un sujeto cambia de una puntuación 0,48 a 0,52, se podría deducir erróneamente que pasó de una etapa F0-F1 a un etapa F2-F3 (o aparición de una fibrosis llamada clínicamente significativa) cuando en realidad la progresión es sólo de 8% (en valor relativo - 0,48 con respecto a 0,52 o $[(0,52-0,48)/0,52] = 0,08$ o 8% - o 4% - 0,52-0,48 = 0,04 - en valor absoluto y no clínicamente significativa.

En definitiva, los inventores han desarrollado las siguientes puntuaciones resumidas en la Tabla 1 abajo:

55

Tabla 1

Propósito de la prueba: medir	Nombre de la prueba	Acrónimo de la prueba
En una hepatitis crónica viral:		
La presencia de una fibrosis hepática	Puntuación no invasiva de	SNIFF

Propósito de la prueba: medir	Nombre de la prueba	Acrónimo de la prueba
En una hepatitis crónica viral :		
clínicamente significativa	fibrosis del hígado	
En una hepatitis crónica alcohólica :		
La presencia de una fibrosis hepática clínicamente significativa	Marcador no invasivo de fibrosis del hígado	SNIFFA
En una esteatosis hepática crónica :		
En cualquier individuo :		
La presencia de una fibrosis hepática clínicamente significativa	Marcador no invasivo de detección de fibrosis del hígado	SNIDAFF
En una hepatitis crónica viral o alcohólica :		
La presencia de una fibrosis hepática clínicamente significativa	Marcador no invasivo de fibrosis del hígado	SNIFFAV

5 El rendimiento diagnóstico es el porcentaje de sujetos clasificados correctamente en relación con la PBH. El rendimiento diagnóstico del marcador de diagnóstico de la presente invención aumenta en los extremos de la puntuación. El marcador diagnóstico SNIFF no clasifica mal ningún enfermo con hepatitis viral para F0 y F4 (y muy poco para F3). En otras palabras, esa marcador SNIFF es muy eficiente (100% de buenas respuestas) para dos preguntas esenciales que se plantea el clínico : existe un riesgo de clasificar erróneamente a un sujeto sin fibrosis o un sujeto con cirrosis ? El rendimiento diagnóstico de una marcador SNIFF con 5 variables es de 90,8% para 50,0% de los enfermos con los valores más bajos y los más altos. Teniendo en cuenta los errores de la PBH especialmente en las etapas bajas (error del observador) y elevados (error de la muestra) de fibrosis, la tasa de error se aproxima por tanto a 0%.

15 El objeto de la invención es, por lo tanto, específicamente determinar con mayor precisión lo que no es posible con herramientas de la técnica anterior, si un paciente con una enfermedad o no del hígado conocida alcanza la fibrosis y la gravedad del daño hepático (nivel de la lesión). La prueba según la invención presenta la ventaja de poder realizarse cada 6 a 12 meses mientras que la PBH sólo puede repetirse, probablemente, cada 3 a 5 años de acuerdo con las conferencias de consenso.

20 El método según la invención consiste en combinar y medir diferentes marcadores de fibrosis directos asociados con marcadores indirectos tomados en una combinación específica, dichos marcadores se denominan variables. Estas variables se miden en una muestra de un sujeto. La elección de estas variables se determinan por el mejor rendimiento global de la combinación de variables obtenida por análisis estadístico de diferentes modelos matemáticos, donde cada uno proporciona una información estadísticamente significativa e independiente otra. En otras palabras, se trata del mejor rendimiento para cualquier número de variables. Esto significa que cualquier variable nueva en el modelo matemático aporta una información inventiva (o ganancia o rendimiento diagnóstico) en comparación con una combinación más pequeña que ya ha sido objeto de una publicación.

30 Por « muestra », se entiende en el contexto de la presente invención una muestra de un sujeto tomada antes de cualquier análisis. Esta muestra puede ser un medio biológico tal como sangre, suero, plasma, orina o saliva de dicho sujeto o una o más células de dicho sujeto, tales como biopsia de tejido y más particularmente una biopsia hepática.

Por « patología hepática », se entiende una patología hepática seleccionada de una fibrosis hepática crónica de origen viral, fibrosis hepática crónica de origen alcohólico y una esteatosis hepática crónica.

35 Por « sujeto », se entiende en el contexto de la presente invención un hombre, una mujer o un animal, jóvenes o adultos, sanos o susceptibles de verse afectado o ya afectado por la patología hepática, como la fibrosis hepática crónica de origen viral, fibrosis hepática crónica de origen alcohólico o una esteatosis hepática crónica o por cualquier otra patología, el sujeto afectado puede o no recibir un tratamiento curativo contra esta patología hepática.

40 La presente invención concierne por lo tanto a un método para diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una patología hepática y/o para supervisar la eficacia de un tratamiento curativo contra una patología hepática en un sujeto que

comprende el establecimiento de al menos un marcador diagnóstico no invasivo, en particular de un marcador diagnóstico de la fibrosis portal y septal de acuerdo con la reivindicación 1.

5 La invención concierne igualmente a una prueba diagnóstico de la fibrosis hepática, que utiliza el método de la invención. Por diagnóstico en el sentido de la presente invención, se entiende el establecimiento de la presencia de una fibrosis y/o de su etapa de evolución. Para establecer el diagnóstico, se prefiere generalmente la especificidad de la prueba o del método empleado .

10 Ventajosamente, las variables clínicas que caracterizan al sujeto se seleccionan entre el peso corporal (peso), el índice de masa corporal (IMC o BMI en inglés o sea la relación peso /(estatura o altura)², la edad (edad) a la fecha de la recogida de la muestra y la causa. Por « causa » (o etiología), se entiende la causa alcohólica o viral. Por consiguiente, es claro para la persona experta que la variable clínica « causa » sólo podrá utilizarse a partir del momento en el que una patología hepática tal como una fibrosis hepática crónica de origen viral o fibrosis hepática crónica de origen alcohólico haya sido diagnosticada previamente.

15 En el método de la invención, antes de la etapa (c), las variables medidas en la etapa (a) o (a') y las variables recogidas en la etapa (b) se pueden combinar entre sí. Por consiguiente, se puede utilizar en la función lógica aplicada en el marco de la invención ya sea « variables nativas » llamadas igualmente « variables aisladas o simples » que son variables que no han sufrido ninguna modificación antes de la introducción en la función lógica, o « variables combinatorias » que son combinaciones aritméticas de variables aisladas entre ellas. A modo de ejemplos de de variables combinatorias útiles en el marco de la presente invención y e forma no exhaustiva, se encuentra :

- GAPRI = ((GGT/45) / PLQ) * 100
- GLOPRI = (GLB / PLQ) * 100
- 25 – GLOTRI = (GLB / TP) * 100
- HYAPRI = (AH / PLQ) * 100
- HYATRI = (AH / TP) * 100
- AMPRI = (A2M / PLQ) * 100
- AMTRI = (A2M / TP) * 100
- 30 – HYAMTRI = (AH * A2M) / (TP * 100)
- HYAMPRI = (AH * A2M) / (A2M * 100) = (AH/100)
- HAMPRI = (AH * A2M) / (PLQ * 100)
- HYAMPTRI = (AH * A2M) / (PLQ * TP)
- GHAMPRI = (GLB * AH * A2M) / (PLQ * 1000)
- 35 – GHAMTRI = (GLB * AH * A2M) / (TP * 1000)
- GHAMPTRI = (GLB * AH * A2M) / (PLQ * TP * 10)

40 Las iniciales de estas variables utilizan la abreviatura de las variables combinatorias aisladas (simples) en el prefijo y sufijo RI significa « índice de relación ».

Tenga en cuenta que un marcador diferente, pero similar en su principio, llamado APRI (= ASAT/PLQ) se publicó (Wai y otros, Hépatology, 2003, vol 38, páginas 518-526). La relación ASAT/ALAT llamada aquí anteriormente RAT forma parte igualmente del estado de la técnica.

45 De acuerdo con la presente invención, se llama marcador no invasivo de fibrosis del hígado (acrónimo : SNIFF) a un marcador compuesto por una combinación de marcadores de preferencia sanguíneos, que varían de 0 a 1, estimador tipo marcador Metavir F para enfermedades hepáticas de origen viral (SNIFF) o alcohólico (SNIFFA) o las dos causas (SNIFFAV) o esteatósica (SNIFFSA).

50 La gravedad de una patología hepática es la evaluación del grado de fibrosis en el hígado.

En la etapa (a') del método de la invención, se miden al menos tres variables en una muestra de dicho sujeto, preferiblemente 4, 5, 6 o 7 variables.

55 Las mediciones realizadas en la etapa (a) o (a') del método de la invención son medidas dirigidas a cuantificar la variable (caso para A2M, AH, bilirrubina, PLQ, TP, urea, NA, glicemia, triglicéridos, ALB, P3P), o para cuantificar la actividad enzimática de la variable (caso para GGT, ASAT, ALAT, PAL). La persona experta conoce diferentes métodos directos o indirectos para cuantificar una sustancia específica o una proteína o su actividad enzimática. Esos métodos puede

implementar una o más anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen dicha proteína en técnicas de inmunoensayos (radio-inmunoensayos o RIA, pruebas ELISA, Western Blot, etc...), el análisis de los niveles de ARNm de dicha proteína utilizando técnicas de tipo Northern Blot, Slot Blot o PCR, técnicas como una HPLC eventualmente combinada con una espectrometría de masas, etc... Las dosificaciones de la actividad de las proteínas citadas precedentemente implementan dosificaciones efectuadas sobre al menos un sustrato específico de cada una de esas proteínas. La Solicitud de Patente Internacional WO03/073822 enumera los métodos utilizables para cuantificar α -2 macroglobulina (A2M) y ácido hialurónico (AH o hialuronato).

A modo de ejemplo y de forma no exhaustiva, una lista preferida de dosificación o de kits comerciales utilizables para las medidas efectuadas en la etapa (a) o (a') del método objeto de la presente invención sobre muestras sanguíneas se da a continuación :

- Tasa de protrombina : el tiempo de Quick (TQ) se determina adicionando al plasma tromboplastina cálcica (por ejemplo Neoplastin CI plus, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) y el tiempo de coagulación se mide en segundos. Para obtener la tasa de protrombina (TP), se traza una curva de calibración a partir de diferentes diluciones de un concentrado de plasma normal estimado en 100%. Los resultados obtenidos para los plasmas de pacientes se expresan en porcentaje con relación al concentrado de plasma normal. El valor superior de TP no está limitado y puede sobrepasar 100%.
- A2M : su dosificación se efectúa por inmunonefelometría láser utilizando por ejemplo un analizador nefelómetro Behring. El reactivo puede ser un anti-suero de conejo contra A2M humano.
- AH : las concentraciones séricas se determinan con un ELISA (por ejemplo : Corgenix, Inc. Biogenic SA 34130 Manguio Francia) que utilizan proteínas específicas que fijan el AH aislado a partir de cartilago bovino.
- P3P : las concentraciones séricas se determinan con un RIA (por ejemplo : RIA-gnost PIIP kit, Hoechst, Tokio, Japón) que utiliza un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra el PIINP de piel bovina.
- PLQ ; las muestras de sangre se recogen en tubos Vacutainer que contienen EDTA (ácido etilendiamina tetraacético) (por ejemplo Becton Dickinson, Francia) y pueden ser analizados en un contador Advia 120 (Bayer diagnóstico).
- Urea : medición por ejemplo por « Kinectic UV assay for urea » (Roche diagnósticos).
- GGT : medición por ejemplo por « Gamma-glutamyltransferase assay standardized against Szasz » (Roche diagnósticos).
- Bilirrubina : medición por ejemplo por « Bilirubin assay » (Jandraasik-Grof method) (Roche diagnósticos).
- PAL : medición por ejemplo por « ALP IFCC » (Roche diagnósticos) .
- ALAT : medición por ejemplo por « ALT IFCC » (Roche diagnósticos).
- ASAT : medición por ejemplo por « AST IFCC » (Roche diagnósticos).
- Sodio : medición por ejemplo por « Electrodo selectivo de ion sodio » (Roche diagnósticos).
- Glicemia : medición por ejemplo por « Glucose GOD-PAP » (Roche diagnósticos).
- Triglicéridos : medición por ejemplo por « triglicéridos GPO-PAP » (Roche diagnósticos).
- Urea, GGT, bilirrubina, fosfatasas alcalinas, sodio, glicemia, ALAT y ASAT pueden medirse en un analizador, por ejemplo, Hitachi 917, Roche diagnósticos GmbH, D-68298 Mannheim, Alemania.
- Gamma-globulinas, albúmina y alfa-2 globulinas : medición por electroforesis de proteínas, por ejemplo : Capillary electrophoresis (Capillarys), SEBIA 23, rue M Robespierre, 92130 Issy Les Moulinaux, Francia.
- ApoA1 : medición por ejemplo por « Determinación de apolipoproteína A-1 » (Dade Behring) con analizador, por ejemplo : BN2 Dade Behring Marburg GmbH, Emil von Behring str. 76, D-35041 Marburg, Alemania.
- TIMP1 : medición por ejemplo por TIMP1- Elisa, Amersham.
- MMP2 ; medición por ejemplo por MMP2- Elisa, Amersham.
- YKL-40 : medición por ejemplo por YKL-40 Biometra,, YKL-40/8020, Quidel Corporation.
- PIIP : medición por ejemplo por PIIP RIA Kit, OCFKO7-PIIP, cis bio international.

Para las variables medidas en la etapa (a) o (a') del método objeto de la presente invención, los valores obtenidos se expresan en :

- mg/dl para α -2 macroglobulina (A2M),
- μ g/l para ácido hialurónico (AH o hialuronato),
- g/l para apolipoproteína A1 (ApOA1)**,
- U/ml para propéptido N-terminal del procolágeno de tipo III (P3P)**,
- UI/l para gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT),

- $\mu\text{mol/l}$ para bilirrubina,
- g/l para gamma-globulinas (GLB)*,
- Giga/l para plaquetas (PLQ),
- % para tasa de protrombina (TP),
- 5 – UI/l para aspartato amino-transferasas (ASAT),
- UI/l para alanina amino-transferasas (ALAT),
- mmol/l triglicéridos*,
- mmol/l para urea*,
- 10 – mmol/l para sodio (NA),
- mmol/l para glicemia*,
- g/l para albúmina (ALB)*,
- UI/l para fosfatasas alcalinas (PAL),
- ng/ml para TIMF1,
- ng/ml para MMP2,
- 15 – ng/ml para YKL-40,
- U/ml para PIIP,
- $\mu\text{g/l}$ para ferritina.

20 Las variables clínicas recogidas en la etapa (b) del método objeto de la presente invención se expresan en

- kg para el peso corporal (peso) a la fecha de recogida de la muestra,
- años para la edad (edad)* a la fecha de la recogida de la muestra,
- kg/m^2 en el BMI o IMC* : kg para el peso corporal, m (metro) para la altura corporal,
- código 1 para la causa alcohólica y 2 para la causa viral.

25 Las variables marcadas con un asterisco (*) se expresan con un (*) o dos (**) decimales, las otras están sin decimal.

30 Ventajosamente, la muestra del sujeto utilizado en la etapa (a) o (a') del método objeto de la presente invención es un medio biológico tal como sangre, suero, plasma, orina o saliva de dicho sujeto o una o más células de dicho sujeto, tales como biopsia de tejido y más particularmente una biopsia hepática. Es concebible, en el marco de la presente invención que las diferentes variables medidas en la etapa (a) o (a') se miden en diferentes muestras del paciente. A modo de ejemplos y de manera no exhaustiva, una variable se mide en la orina del sujeto, mientras que otras tres se miden en la sangre del mismo sujeto, las dos muestras (sangre y orina) se realizan en un lapso de tiempo relativamente corto. Sin embargo y de forma preferida, la muestra del sujeto utilizada en la etapa (a) o (a') del método objeto de la presente invención es una muestra sanguínea efectuada en el sujeto antes de cualquier otra medición.

40 De acuerdo con un primer modo de realización de la presente invención, se combina, en la etapa (c) del método objeto de la presente invención, las variables α -2 macroglobulina (A2M) y tasa de protrombina (TP) y al menos dos variables escogidas entre plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea, ácido hialurónico (AH) y edad. Ventajosamente, el marcador obtenido es un marcador no invasivo de la fibrosis del hígado de origen viral de al menos 4 variables.

Entre los marcadores preferidos susceptibles de ser obtenidos en el primer modo de realización, se prefieren los marcadores para los cuales en la etapa (c) se combinan :

- 45 – α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), ácido hialurónico (AH) y edad (marcador llamado SNIFF 4a) ;
- α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT) y edad (marcador llamado SNIFF 4b) ;
- α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT) y edad (marcador llamado SNIFF 5) ;
- 50 – α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea y ácido hialurónico (AH) (marcador llamado SNIFF 6) ;
- α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea, ácido hialurónico (AH) y edad (marcador llamado SNIFF 7).

55 La puntuación que puede ser obtenida de este modo es un resultado no invasivo de fibrosis del hígado de origen viral llamado SNIFF, que da una puntuación de 0 a 1 estimada de la puntuación de tipo Metavir F que usa de 4 a 7 variables.

En un segundo modo de realización de la presente invención, en la etapa (c) se combinan, además de la variable tasa de protrombina (TP), al menos tres variables escogidas entre aspartato amino-transferasa (ASAT), alanina amino-transferasa (ALAT) y fosfatasas alcalinas (PAL), edad, ácido hialurónico (AH o hialuronato) y α -2 macroglobulina (A2M). La puntuación que puede obtenerse así es un resultado no invasivo de fibrosis del hígado de origen alcohólico llamado SNIFFA.

5

Entre las puntuaciones preferidas susceptibles de ser obtenidas en este segundo modo de realización, se prefieren las puntuaciones para las cuales en la etapa (c) se combinan:

- 10 – tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT), alanina amino-transferasa (ALAT) y fosfatasas alcalinas (PAL) (marcador llamado SNIFFA 4b),
- tasa de protrombina (TP), edad, ácido hialurónico (AH o hialuronato) y α -2 macroglobulina (A2M) (marcador llamado SNIFFA 4c).

15 En un tercer modo de realización de la presente invención, una puntuación llamada SNIDAFF que es un resultado no invasivo de detección de la fibrosis del hígado a partir de variables usuales para las hepatopatías alcohólicas y virales pueden obtenerse las variante de 0 a 1. Por detección en el sentido de la presente invención, se entiende la búsqueda de la presencia de una fibrosis cualquiera que sea su estado, tanto de los pacientes sin enfermedad del hígado conocida, como de los pacientes con enfermedad crónica del hígado conocida. Para la detección, la sensibilidad de la prueba es un criterio particularmente importante.

20

La puntuación SNIDAFF puede obtenerse ventajosamente combinando en la etapa (c) del método de la presente invención, al menos las cuatro variables siguientes : plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT) y edad. De forma preferida, se combinan, en la etapa (c), además de las cuatro variables descritas precedentemente, al menos una y de preferencia al menos dos variables escogidas entre fosfatasas alcalinas (PAL), α -2 macroglobulina (A2M) y urea.

25

Entre las puntuaciones preferidas susceptibles de ser obtenidas en este cuarto modo de realización, se prefieren las puntuaciones para las cuales en la etapa (c) se combinan :

- 30 – plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT), edad, fosfatasas alcalinas (PAL) y α -2 macroglobulina (marcador llamado SNIDAFF 6a) ;
- plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT), edad, fosfatasas alcalinas (PAL) y urea (marcador llamado SNIDAFF 6b).

35 En un cuarto modo de realización de la presente invención, la puntuación llamada SNIFFAV que es un resultado no invasivo de la fibrosis del hígado para las hepatopatías virales o alcohólicas pueden obtenerse las variantes de 0 a 1. el marcador SNIFF AV puede obtenerse ventajosamente combinando en la etapa (c) del método de la presente invención, al menos cinco de las 6 variables siguientes ; α -2 macroglobulina (A2M), plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), urea, ácido hialurónico (AH o hialuronato) o causa.

40

Entre las puntuaciones preferidas susceptibles de ser obtenidas en este cuarto modo de realización, se prefieren las puntuaciones para las cuales en la etapa (c) se combinan :

- 45 – α -2 macroglobulina (A2M), plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), urea, ácido hialurónico (AH o hialuronato) (marcador llamado SNIFFAV 5).
- α -2 macroglobulina (A2M), plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), urea, ácido hialurónico (AH o hialuronato) y causa (marcador llamado SNIFFAV 6).

50 Según una forma de llevar a cabo esta variante de la invención, se mide en la etapa (a') de la invención las tres variables biológicas siguientes : tasa de protrombina (TP), alanina amino-transferasa (ALAT) y fosfatasas alcalinas (PAL). Estas tres variables combinadas en a etapa (c') de la presente invención permiten obtener el marcador SNIFF A 3 (resultado no invasivo de fibrosis del hígado de origen alcohólico de 3 variables).

55 Además, de forma alternativa, los marcadores no invasivos de fibrosis del hígado llamados SNIFFA de origen alcohólico utilizan cuatro variables. Así, el marcador SNIFF A 4 que usa cuatro variables se determina combinando en la etapa (c') las variables siguientes : α -2 macroglobulina (A2M), edad, ácido hialurónico (AH o hialuronato) y alanina amino-transferasa (ALAT) que permiten obtener el marcador SNIFF A 4a.

Las puntuaciones SNIFF, SNIFFA, SNIDAFF y SNIFFAV (o variable dependiente) se predicen por una combinación de marcadores biológicos o clínicos (o variables independientes). Esas combinaciones (o modelos) se obtuvieron por el método estadístico llamado regresión lógica binaria con el procedimiento siguiente :

En un primer momento, las variables independientes se probaron en análisis univariado.

En un segundo momento, las variables independientes significativas en el análisis univariado se probaron en el análisis multivariante por regresión lógica binaria con selección paso a paso hacia arriba o hacia abajo.

La regresión lógica produce la fórmula de cada marcador bajo la forma :

$$\text{Marcador} = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots$$

donde los coeficientes a_i son constantes y las variables x_i son las variables independientes.

Ese marcador corresponde al log de p donde p es la probabilidad de existencia de una fibrosis clínicamente significativa. Esta probabilidad p se calcula con la fórmula :

$$p = \frac{\exp(a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots)}{1 + \exp(a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots)}$$

$$p = \frac{1}{1 + \exp(-a_0 - a_1 x_1 - a_2 x_2 - \dots)}$$

donde los coeficientes a_i y las variables x_i corresponden a aquellos de la fórmula del marcador. La existencia de una lesión (por ejemplo, fibrosis clínicamente significativa) se determina por una probabilidad p superior a 0,5 (a menos que se especifique lo contrario). Tenga en cuenta que los términos « marcador » de regresión lógica y « marcador » SNIFF no corresponden al mismo término de las ecuaciones precedentes. En la aplicación clínica SNIFF corresponde a p.

Damos a continuación las tablas para cada marcador SNIFF con el nombre de cada variable independiente en la primera columna, en la segunda columna el valor del coeficiente de a_i asociado (llamado β en el texto abajo y, a menudo en la literatura y B en las tablas abajo), y después su desviación estándar (llamada E.S en las tablas abajo) y después su grado de significación (llamado significado en las tablas abajo) y las 2 últimas columnas dan el intervalo de confianza de $\exp(a_i)$, es decir el intervalo de confianza (llamado IC en las tablas abajo) del odds-ratio correspondiente (llamado $\exp(\beta)$ en las tablas).

Para cada marcador SNIFF, tal como que se define en las variantes de la invención arriba, el valor predictivo global del modelo se refleja por el « porcentaje global » de sujetos bien clasificados en una segunda tabla.

Para cada marcador, en la ecuación aplicable, el coeficiente β_i de cada variable x_i independiente puede variar del valor β dado en la tabla correspondiente a dicho marcador $\pm 3,3$ desviaciones estándar, valor que se da igualmente en las tablas. Del mismo modo, a_0 puede variar del valor de la constante que se da en las tablas $\pm 3,3$ desviaciones estándar.

A modo de ejemplo y sobre la base de las tablas a continuación, la persona experta que desea realizar el marcador SNIFF 4a a 4 marcadores utilizará la fórmula siguiente : $p = 1/(1 + \exp(-a_0 - a_1 (\text{AH en } \mu\text{g/l}) - a_2 (\text{TP en } \%) - a_3 (\text{A2M en mg/dl}) - a_4 (\text{EDAD en años})))$ con

- a_0 comprendido entre -3,130 y 7,860 ($2,365 \pm 3,3 \cdot 1,665$) y, de preferencia, a_0 vale 2,365
- a_1 comprendido entre -0,002 y 0,024 ($0,011 \pm 3,3 \cdot 0,004$) y, de preferencia, a_1 vale 0,011
- a_2 comprendido entre -0,118 y -0,006 ($-0,062 \pm 3,3 \cdot 0,017$) y, de preferencia, a_2 vale -0,062
- a_3 comprendido entre 0,003 y 0,009 ($0,006 \pm 3,3 \cdot 0,001$) y, de preferencia, a_3 vale 0,006
- a_4 comprendido entre -0,016 y 0,076 ($0,030 \pm 3,3 \cdot 0,014$) y, de preferencia, a_4 vale 0,030.

El marcador SNIFF se expresa de forma bruta (todos los sujetos se incluyen) u optimizada, en ese caso los sujetos extremos, caracterizado por un residuo de student mayor que 3, se excluyen del análisis. Su número siempre se reduce, como regla $\leq 5\%$. Por esta razón, entre las tablas indicadas más adelante, algunas indicadas por un « o » como por ejemplo SNIFF 4ao proporcionan los coeficientes β obtenidos después de la optimización.

Por otra parte, los expertos en la técnica que deseen utilizar los marcadores de la presente invención para los cuales las diferentes constantes a_0 e a_i no se proporcionaron en la presente invención es capaz de determinar dichas constantes. Es necesario disponer entonces de una base de datos que comprenda las variables independientes utilizadas (como mediciones de la etapa a y b) y una población de sujetos que tienen la patología estudiada (alcohol y/o virus o esteatosis), idealmente varias centenas de sujetos, y después calcular los coeficientes a_i (o β) como se indica en la etapa c y como se

ES 2 455 229 T3

explicó arriba. La variable dependiente es la lesión investigada, por ejemplo, una fibrosis clínicamente significativa definida por un marcador Metavir ≥ 2 .

1. Para SNIFF 4a (3 marcadores de fibrosis + edad) :

Variable	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
AH	0,0111	0,0041	0,004	1,011	1,003	1,018
TP	-0,062	0,017	0	0,94	0,91	0,971
A2M	0,006	0,001	0	1,006	1,003	1,009
EDAD	0,03	0,014	0,028	1,03	1,003	1,058
Constante	2,365	1,665	0,156	10,641		

5

Tabla de clasificación. El valor de corte es, 500

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapas 4	F0+1 vs 2-4	,00	107	27	79,9
		1,00	37	127	77,4
	Porcentaje global				78,5

2. Para SNIFF 4ao (3 marcadores de fibrosis + edad) :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
AH	,011	,004	,007	1,011	1,003	1,020
TP	-,084	,019	,000	,919	,886	,955
A2M	,008	,002	,000	1,009	1,005	1,012
EDAD	,046	,015	,002	1,047	1,017	1,078
Constante	3,232	1,843	,080	25,334		
	Observado		Previsto			
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto	
			,00	1,00		
Etapas	F0+1 vs 2-4	,00	105	25	80,8	
		1,00	35	127	78,4	
	Porcentaje global				79,5	

10 Tabla de clasificación. El valor de corte es, 500

3. Para SNIFF 4b con 3 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,067	,016	,000	,936	,906	,966
A2M	,006	,002	,001	1,005	1,002	1,008

ES 2 455 229 T3

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
EDAD	,049	,013	,000	1,050	1,023	1,077
ASAT	,018	,005	,000	1,019	1,009	1,028
Constante	2,024	1,647	,219	7,567		

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa 4	F0+1 vs 2-4	,00	106	29	78,5
		1,00	39	132	77,2
	Porcentaje global				77,8

a El valor de corte es ,500

4. Para SNIFF 4bo con 3 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,091	,020	,000	,913	,878	,949
ASAT	,023	,008	,000	1,023	1,012	1,035
A2M	,008	,002	,000	1,008	1,005	1,012
EDAD	,072	,015	,000	1,074	1,042	1,107
Constante	2,412	1,902	,205	11,154		

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
	F0+1 vs 2-4	,00	102	26	79,7
		1,00	36	134	78,8
	Porcentaje global				79,2

5 Tabla de clasificación. El valor de corte es ,500.

5. Para SNIFF 5 con 4 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLAQUETAS	-,007	,002	,002	,993	,988	,997
TP	-,059	,017	,000	,943	,912	,975
ASAT	,015	,005	,002	1,015	1,005	1,025
A2M	,005	,002	,001	1,005	1,002	1,009
EDAD	,040	,013	,003	1,041	1,014	1,069

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
Constante	3,285	1,736	,058	26,707		

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa 5	F0+1 vs 2-4	,00	110	23	82,7
		1,00	36	135	78,9
	Porcentaje global				80,6

a El valor de corte es ,500

6. Para SNIFF 50 con 4 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,082	,020	,000	,921	,885	,959
A2M	,009	,002	,000	1,009	1,005	1,013
EDAD	,058	,015	,000	1,059	1,028	1,092
PLQ	-,008	,003	,002	,992	,986	,997
ASAT	,020	,006	,001	1,020	1,009	1,032
Constante	4,034	2,004	,044	56,508		

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
	F0+1 vs 2-4	,00	102	25	80,3
		1,00	32	138	81,2
	Porcentaje global				80,8

5 Tabla de clasificación. El valor de corte es ,500.

7. Para SNIFF 6 con 5+1 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLAQUETAS	-,008	,002	,001	,992	,987	,996
ASAT	,010	,005	,038	1,010	1,001	1,020
UREA	-,266	,084	,002	,767	,650	,904
HIALU	,023	,006	,000	1,023	1,011	1,035
AMTRI	,006	,001	,000	1,006	1,003	1,009
Constante	,050	,774	,948	1,052		

Con AMTRI : (A2M / TP) x 100

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa 5	F0+1 vs 2-4	,00	110	22	83,3
		1,00	35	130	78,8
	Porcentaje global				80,8

a El valor de corte es ,500

**8. Para SNIFF 6o optimizado con 5+1 marcadores de fibrosis :
Variables en la ecuación**

		B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)
Etapa	PLAQUETAS	-,010	,003	12,743	1	,000	,990
	ASAT	,011	,005	4,295	1	,038	1,011
	UREA	-,365	,096	14,434	1	,000	,694
	AH	,037	,009	18,482	1	,000	1,038
	AMTRI	,007	,002	21,531	1	,000	1,007
	Constante	,171	,881	,038	1	,846	1,187

5

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa	F0+1 vs 2-4	,00	106	22	82,8
		1,00	30	135	81,8
	Porcentaje global				82,3

a El valor de corte es ,500

Con AMTRI (A2M / TP) x 100

9. Para SNIFF 7 con 6 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLAQUETAS	-,007	,003	,004	,993	,988	,998
ASAT	,012	,005	,021	1,012	1,002	1,022
UREA	-,270	,088	,002	,764	,643	,907
HIALU	,021	,006	,001	1,021	1,009	1,033
TP	-,049	,018	,007	,952	,919	,987
A2M	,005	,002	,003	1,005	1,002	1,008
EDAD	,027	,015	,063	1,028	,998	1,058
Constante	3,718	1,929	,054	41,173		

10

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa 7	F0+1 vs 2-4	,00	111	21	84,1
		1,00	32	132	80,5
	Porcentaje global				82,1
a El valor de corte es ,500					

Variante **SNIFF 7a** con corte diferente para suprimir los falsos negativos Metavir F3, los coeficientes β no cambian.

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
	F0+1 vs 2-4	,00	90	42	68,2
		1,00	19	145	88,4
	Porcentaje global				79,4
El valor de corte es ,370					

10. Para SNIFF 7o optimizado con 6 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLAQUETAS	-,010	,003	,001	,990	,984	,996
ASAT	,014	,006	,009	1,015	1,004	1,028
UREA	-,401	,105	,000	,669	,544	,823
HIALU	,038	,009	,000	1,039	1,020	1,058
TP	-,062	,021	,003	,940	,902	,979
A2M	,006	,002	,002	1,006	1,002	1,009
EDAD	,042	,017	,012	1,043	1,009	1,078
Constante	4,873	2,214	,028	130,764		

5

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa 7	F0+1 vs 2-4	,00	108	20	84,4
		1,00	29	133	82,1
	Porcentaje global				83,1
a El valor de corte es ,500					

Variante **SNIFF 7bo** optimizada con corte diferente para suprimir los falsos negativos Metavir F3, los coeficientes β no cambian.

	Observado		Previsto		
--	-----------	--	----------	--	--

ES 2 455 229 T3

		F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
		,00	1,00	
F0+1 vs 2-4	,00	88	42	67,2
	1,00	15	147	90,7
Porcentaje global				80,3

El valor de corte es ,290

11. Para SNIFFA 3 con 3 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95.0%	
					Inferior	Superior
TP	-,161	,047	,001	,851	,776	,934
ALAT	-,020	,009	,031	,980	,963	,998
PAL	,030	,011	,007	1,031	1,008	1,054
Constante	13,510	4,556	,003	736506,803		

5

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto		
		F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
		,00	1,00	
F0+1 vs 2-4	,00	24	5	82,8
	1,00	8	57	87,7
Porcentaje global				86,2
a El valor de corte es ,500				

12. Para SNIFFA 3o con 3 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,301	,095	,002	,740	,614	,892
ALAT	-,036	,013	,007	,965	,940	,990
PAL	,040	,016	,010	1,041	1,010	1,073
Constante	27,447	9,265	,003	831966014903,050		

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto		
		F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
		,00	1,00	
F0+1 vs 2-4	,00	23	3	88,5
	1,00	4	61	93,8
Porcentaje global				92,3
a El valor de corte es ,500				

10

13. Para SNIFFA 4a con 3 marcadores de fibrosis + edad :

ES 2 455 229 T3

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
EDAD	-,099	,049	,042	,906	,823	,996
ALAT	-,032	,015	,027	,968	,941	,996
HIALU	,036	,013	,007	1,038	1,010	1,064
A2M	,019	,008	,017	1,019	1,003	1,035
Constante	-,310	2,437	,899	,734		

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		Porcentaje correcto
			F0+1 vs 2-4		
			,00	1,00	
Etapa 1	F0+1 vs 24	,00	23	4	85,2
		1,00	7	54	88,5
	Porcentaje global				87,5

a El valor de corte es ,500

14. Para SNIFFA 4ao con 3 marcadores de fibrosis + edad:

5

Variables en la ecuación

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
							Inferior	Superior
ALAT	-,042	,017	6,092	1	,014	,959	,927	,991
AH	,034	,012	7,694	1	,006	1,034	1,010	1,059
A2M	,029	,012	6,400	1	,011	1,030	1,007	1,053
EDAD	-,176	,072	5,968	1	,015	,838	,728	,966
Constante	1,038	2,549	,166	1	,684	2,825		

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		Porcentaje correcto
			F0+1 vs 2-4		
			,00	1,00	
Etapa	F0+1 vs 2-4	,00	24	3	88,9
		1,00	4	55	93,2
	Porcentaje global				91,9

a El valor de corte es ,600

10

15. Para SNIFFA 4b con 4 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,187	,054	,001	,830	,746	,923

ES 2 455 229 T3

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95.0%	
					Inferior	Superior
ALAT	-,026	,010	,012	,974	,955	,994
PAL	,036	,012	,004	1,036	1,012	1,061
RAT	-,739	,427	,083	,477	,207	1,103
Constante	16,629	5,327	,002	16674698,481		

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto			Porcentaje correcto
		F0+1 vs 2-4			
		,00	1,00		
F0+1 vs 2-4	,00	25	4	86,2	
	1,00	7	58	89,2	
Porcentaje global					88,3
a El valor de corte es ,500					

Con RAT = ASAT / ALAT

5 **16. Para SNIFFA 4bo con 4 marcadores de fibrosis :**

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
TP	-,435	,165	,008	,648	,469	,894
ALAT	-,058	,023	,012	,944	,902	,988
PAL	,088	,033	,007	1,092	1,026	1,164
RAT	-1,958	,818	,017	,141	,028	,701
Constante	39,515	15,768	,012	144962082235443400,000		

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto			Porcentaje correcto
		F0+1 vs 2-4			
		,00	1,00		
F0+1 vs 2-4	,00	23	2	92,0	
	1,00	4	59	93,7	
Porcentaje global					93,2
a El valor de corte es ,500					

Con RAT = ASAT / ALAT

10 **Variante SNIFF 4b2o** optimizada con corte diferente para suprimir los falsos positivos Metavir F0, los coeficientes β no cambian.

Observado		Previsto			Porcentaje correcto
		F0+1 vs 2-4			
		,00	1,00		
F0+1 vs 2-4	,00	24	1	96,0	

	Observado	Previsto		
		F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
		,00	1,00	
	1,00	4	59	93,7
Porcentaje global				94,3

El valor de corte es ,550

17. Para SNIFFA 4c con 3 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
AH	,032	,012	,007	1,032	1,009.	1,056
A2M	,015	,008	,068	1,015	,999	1,032
EDAD	-,140	,058	,015	,869	,776	,973
TP	-,169	,067	,012	,845	,741	,963
Constante	16,541	7,858	,035	15263638,220		
	Observado	Previsto			Porcentaje correcto	
		F0+1 vs 2-4				
		,00	1,00			
	F0+1 vs 2-4	,00	25	2	92,6	
		1,00	5	56	91,8	
Porcentaje global					92,0	

5 Tabla de clasificación. El corte es a 0,50.

18. Para SNIFFA 4co con 3 marcadores de fibrosis + edad :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
AH	,078	,031	,013		1,081	1,017
A2M	,049	,024	,047		1,050	1,001
EDAD	-,560	,219	,011		,571	,372
TP	-,629	,266	,018		,533	,316
Constante	68,252	29,471	,021	43808673511370180000000000000,0		
	Observado	Previsto			Porcentaje correcto	
		F0+1 vs 2-4				
		,00	1,00			
	F0+1 vs 2-4	,00	25	0	100,0	
		1,00	2	58	96,7	
Porcentaje global					97,6	

Tabla de clasificación. El corte es a 0,62.

19. Para SNIDAFF 6a con 5 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95.0%	
					Inferior	Superior
EDAD	,031	,012	,008	1,032	1,008	1,056
plaquetas	-,008	,002	,002	,994	,990	,998
TP	-,076	,015	,000	,927	,900	,956
ASAT	,008	,004	,040	1,008	1,000	1,016
PAL	,007	,003	,036	1,007	1,000	1,014
A2M	,006	,001	,000	1,006	1,003	1,009
Constante	4,575	1,602	,004	97,048		

5

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto			Porcentaje correcto
		F0+1 vs 2-4			
		,00	1,00		
F0+1 vs 2-4	,00	114	40		74,0
	1,00	34	189		84,8
Porcentaje global					80,4

a El valor de corte es ,470

20. Para SNIDAFF 6b con 5 marcadores de fibrosis :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 96,0%	
					Inferior	Superior
EDAD	,061	,012	,000	1,063	1,038	1,089
PLAQUETAS	-,010	,002	,000	,990	,986	,995
TP	-,101	,017	,000	,904	,874	,935
ASAT	,017	,004	,000	1,017	1,008	1,026
PAL	,015	,004	,000	1,015	1,007	1,023
UREA	-,157	,066	,017	,855	,751	,973
Constante	7,817	1,741	,000	2483,002		

Tabla de clasificación(a)

Observado		Previsto			Porcentaje correcto
		F0+1 vs 2-4			
		,00	1,00		
F0+1 vs 2-4	,00	109	60		64,5
	1,00	35	215		86,0
Porcentaje global					77,3

a El valor de corte es ,400

27. Para SNIFFAV 5 :

Variables en la ecuación

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
plaquetas	-,008	,002	,000	,992	,988	,997
TP	-,051	,017	,002	,950	,920	,982
AH	,019	,004	,000	1,020	1,011	1,028
A2M	,007	,001	,000	1,007	1,004	1,010
UREA	-,199	,065	,002	,819	,721	,931
Constante	4,648	1,665	,005	104,330		

5

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapa	F0+1 vs 2-4	,00	131	28	82,4
		1,00	40	186	82,3
	Porcentaje global				82,3

a El valor de corte es ,500

28. Para SNIFFAV 5o :

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLQ	-,009	,002	,000	,991	,986	,996
TP	-,076	,020	,000	,927	,891	,964
UREA	-,314	,083	,000	,731	,621	,861
AH	,035	,007	,000	1,036	1,021	1,051
A2M	,008	,002	,000	1,008	1,005	1,012
Constante	7,105	2,036	,000	1218,006		

10

Tabla de clasificación

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
	F0+1 vs 2-4	,00	121	29	80,7
		1,00	30	194	86,6
	Porcentaje global				84,2

El valor de corte es ,490

29. Para SNIFFAV 6 :

Variables en la ecuación

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
plaquetas	-,008	,002	,000	,992	,988	,996
TP	-,052	,016	,002	,950	,920	,981
AH	,023	,005	,000	1,024	1,014	1,033
A2M	,007	,001	,000	1,007	1,004	1,010
CAUSA	1,086	,442	,014	2,963	1,247	7,043
UREA	-,271	,073	,000	,762	,660	,880
Constante	3,124	1,752	,075	22,737		

Tabla de clasificación(a)

	Observado		Previsto		
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto
			,00	1,00	
Etapas	F0+1 vs 2-4	,00	133	26	83,6
		1,00	38	188	83,2
	Porcentaje global				83,4
a El valor de corte es ,500					

5 **30. Para SNIFFAV 6o :**

	B	E.S.	Signif.	Exp(B)	IC para Exp(B) 95,0%	
					Inferior	Superior
PLQ	-,010	,003	,000	,990	,985	,995
TP	-,055	,018	,002	,946	,913	,981
UREA	-,398	,090	,000	,673	,564	,803
AH	,041	,008	,000	1,042	1,026	1,058
A2M	,008	,002	,000	1,008	1,005	1,011
ETIO	-1,648	,517	,001	,192	,070	,530
Constante	5,974	1,925	,002	392,931		
	Observado		Previsto			
			F0+1 vs 2-4		Porcentaje correcto	
			,00	1,00		
	F0+1 vs 2-4	,00	123	29	80,9	
		1,00	36	189	84,0	
	Porcentaje global				82,8	

El valor de corte es ,500. Como se puede constatar el aumento de rendimiento no sucede en el rendimiento diagnóstico (82,8 vs 83,4 %) sino en otros indicadores de rendimiento como el área bajo la curva ROC (0,910 vs 0,890).

- 10 Otras ventajas y características de la invención aparecerán en los ejemplos que siguen, dados a modo de ilustración, y en los que se hará referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales :

- la figura 1 muestra la curva ROC obtenida a partir de la puntuación SNIFF 7bo para la fibrosis clínicamente significativa. La C estadística (o área bajo la curva ROC) es $0,910 \pm 0,016$.
- la figura 2 es una representación de los trazos Box (mediana, cuartiles y extremos) de el marcador SNIFF 7bo de 7 variables versus la puntuación F de Metavir (la referencia se mide por la PBH),
- la figura 3 el marcador SNIFF 7bo de 7 variables versus la puntuación F de Metavir (la referencia se mide por la PBH),
- la figura 4 presenta la distribución de los grupos predichos ($\geq F2$: 0 : no, 1 : si) de el marcador SNIFF 7bo de 7 variables en función de la puntuación Metavir F,
- la figura 5 presenta el rendimiento diagnóstico de el marcador SNIFF 5 en función de su valor,
- la figura 6 presenta la correlación entre SNIFF 5o de 5 variables y el área de fibrosis. Esto se compara con la Figura 3 (correlación SNIFF 7bo de 7 variables y el marcador F) ya que son los mejores índices para las hepatopatías virales.
- la figura 7 presenta la correlación entre SNIFF 4bo de 4 variables y el marcador F (Figura 7A) y entre SNIFF 4o de 4 variables y el área de fibrosis (Figura 7B) (mejores índices para las hepatopatías alcohólicas), FCS : fibrosis clínicamente significativa.
- la figura 8 presenta una comparación de las curvas ROC de Fibrotest 7 variables (índice C : 0,839) y de SNIFF 7o de 7 variables (índice C : 0,900) en una población de 238 pacientes. La diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,0036$ por el método de Hanley-McNeil).
- la figura 9 presenta una comparación de los trazos Box de Fibrotest con 7 variables y de SNIFF 7bo con 7 variables en una misma población de 238 enfermos con hepatitis viral. Los diagramas de caja de 7bo SNIFF son más bajos para las etapas Metavir F0 y F1 y más elevados para las etapas Metavir F2, F3 y F4 que los del Fibrotest 7 lo que explica así el mejor poder discriminante de SNIFF 7bo para la fibrosis clínicamente significativa que se determina en comparación con la cesura 0,50 para Fibrotest y 0,29 para SNIFF 7bo.

Ejemplo 1 : Determinación de una marcador SNIFF .

A. Pacientes.

El paciente con una enfermedad crónica del hígado tiene una muestra de sangre. Las variables biológicas sanguíneas simples se determinan de acuerdo a las buenas practicas de laboratorio. Los resultados se expresan con las unidades previamente especificadas.

B. Métodos de medición.

La concentración en hialuronato en una muestra sanguínea se mide por una técnica radioinmunoensayo (Kabi-Pharmacia RIA diagnósticos, Uppsala, Suecia).

La concentración en A₂M se determina por inmunonefelometría láser utilizando un nefelómetro analizador Behring. El reactivo es un antisuero de conejo anti-A2M humano.

Le tasa de protrombina se mide a partir del tiempo de Quick (TQ) que se determina adicionando al plasma tromboplastina cálcica (por ejemplo Neoplastin Cl plus, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) y el tiempo de coagulación se mide en segundos. Para obtener la tasa de protrombina (TP), se traza una curva de calibración a partir de diferentes diluciones de un concentrado de plasma normal estimado en 100%.

C. Cálculo del marcador SNIFF.

Los resultados de las variables aisladas (o simples) se utilizan tal cual o después de la transformación en variables combinatorias cuando proceda. El conjunto de esas variables se incluye en la fórmula de regresión lógica. A modo de ejemplo y sobre la base de las tablas descritas anteriormente y un ejemplo de aplicación de la fórmula ya descrita, la persona experta que desea aplicar el marcador SNIFF 4a de 4 marcadores utilizará la fórmula siguiente :

$$p = 1 / (1 + \exp(- a_0 - a_1(AH \text{ en } \mu\text{g}/\text{l}) - a_2(TP \text{ en } \%) - a_3(A2M \text{ en } \text{mg}/\text{dl}) - a_4(AGE \text{ en años })))$$

O sea

$$p = 1 / (1 + \exp(-2,365 - (0,011 * (AH \text{ en } \mu\text{g/l})) - (-0,062 * (TP \text{ en } \%) - (0,006 * (A2M \text{ en } \text{mg/dl})) - (0,030 * (AGE \text{ en años }))))$$

Se dan dos ejemplos opuestos :

Caso	AH ($\mu\text{g/l}$)	TP (%)	A2M (mg/dl)	Edad (años)	Probabilidad
1	273	90	374	64,0	0,981
5	25	89	157	30,2	0,273

5

El caso 1 se clasifica con fibrosis hepática clínicamente significativa y el caso 5 no tiene según el corte fijado a 0,50.

Ejemplo 2 : Rendimiento de los marcadores de la invención y comparación de los resultados obtenidos con los marcadores de la invención y los métodos del estado de la técnica.

10

La curva ROC (figura 1) representa la especificidad y la sensibilidad en función del valor de la prueba. Esta se mide por el índice C que se considera como clínicamente pertinente a partir de 0,7. Mientras más se aproxima la curva a la esquina superior izquierda del cuadro (sensibilidad y especificidad del 100%) mejor es esta. Esto se mide por el área bajo la curva ROC (AUROC) llamada también C estadística. Es posible comparar estos AUROC con el interés adicional de permitir demostrar el efecto sorprendente de los marcadores SNIFF según la invención (figura 8).

15

El índice C obtenido en el marco de las pruebas de la invención tiene un valor de $0,841 \pm 0,025$ para el marcador SNIFF 5 y de $0,910 \pm 0,016$ para el marcador SNIFF 7bo (figura 8). Estos índices C son por lo tanto clínicamente pertinentes.

20

Los diagramas de caja que se presentan en la figura 2 muestran la distribución estadística de las clases de SNIFF de acuerdo con las etapas Metavir F : mediana (línea horizontal negra gruesa), cuartiles (límites superior e inferior del rectángulo gris) y extremas (barras horizontales en los extremos). Se trata del marcador SNIFF 7bo.

25

En la figura 3, es la misma expresión de los resultados de la figura 2, pero que muestra los datos en bruto individuales de SNIFF 7bo obtenidos con la implementación de 7 variables en función del marcador Metavir F. También incluyen los grupos predichos : $\geq F2$: 0 (cuadrado) : no, 1 : si (círculo) (Figura 3). Esta figura permite ver la superposición del marcador en particular entre las etapas F2 y F3 de Metavir. Al contrario, en las poblaciones numerosas, representa mal la distribución debido al hecho específicamente de las superposiciones de los valores individuales.

30

La figura 4 es una expresión diferente de la figura precedente (Figura 3) donde los enfermos se reagrupan por grupo predicho de fibrosis clínicamente significativo predicho : $\geq F2$: 0 (gris) : no, 1 : si (negro). Esto corresponde a los cuadrados y círculos, respectivamente, de la figura 3. SNIFF no clasifica mal a ningún enfermo para F0 y F4 y muy poco para F3 (ninguno en el caso de SNIFF 7bo de la figura 4). Dicho de otra forma, en la práctica SNIFF 7bo clasifica bien 100% de los enfermos para la ausencia de la fibrosis o la presencia de cirrosis.

35

Como uno podría adivinar en las figuras anteriores, la figura 5 permite ver que el rendimiento diagnóstico es excelente para los valores bajos y elevados y disminuye para los valores medios del marcador. Así, el rendimiento diagnóstico es de 90,8% para 50,0% de los enfermos con un marcador SNIFF 5 (figura 5).

40

El marcador SNIFF 7 de 7 variables da un estimado menos elevado de la fibrosis : $r = 0.769$, $p < 10^{-4}$ que el índice SNIFF 5o de 5 variables : $r = 0.803$, $p < 10^{-4}$.

Esta comparación muestra que el estimador SNIFF del área de fibrosis (figura 6) es un índice más fiable (preciso) que el marcador SNIFF de fibrosis.

45

De igual forma el marcador SNIFF A 4bo de 4 variables da un estimado menos elevado de la fibrosis : $r = 0.847$, $p < 10^{-4}$ que el índice SNIFF A 4o de 4 variables : $r = 0.914$, $p < 10^{-4}$.

50

Esta comparación muestra que el estimador SNIFF A del área de fibrosis es un índice más fiable (preciso) que el marcador SNIFF A de fibrosis (figura 7) igualmente en las hepatopatías alcohólicas.

La comparación de los rendimientos de SNIFF y Fibrotest muestran que el rendimiento diagnóstico del Fibrotest 7 es de 74,2 % vs 82,1 % para SNIFF 7. Las AUROC permiten mostrar que la diferencia de rendimiento es estadísticamente muy significativa (figura 8). La figura 9 muestra de forma gráfica el mejor poder discriminante de SNIFF 7 sobre Fibrotest 7.

REFERENCIAS

- 5 1. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet M, Bedossa P, Aubé C y otros, Calès P. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-16.
2. Croquet V, Vuillemin E, Ternisien C, Pilette C, Oberti F, Gallois Y, Trossaert M, Rousselet MC, Chappard D, Calés P. Prothrombin index is an indirect marker of severe liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14: 1133-41.
3. Pilette C, Calès P. Existe-t-il des marqueurs sanguins de fibrose hépatique utilisables en pratique clinique ? *Rev Med Interne* 2002;23:885-8.
- 10 4. Pilette C, Rousselet M, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H y otros, Calès P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores : comparison with sérum markers. *J Hepatol* 1998; 28:439-46.
5. Aubé C, Oberti F, Korali N, Korali N, Namour A, L y otros, Calès P. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol* 1999; 30:472-8.
- 15 6. Moal F, Chappard D, Wang J, Vuillemin E, Michalak-Provost S, Rousselet MC, Oberti F, Calès P. Fractal dimension can distinguish models and pharmacological changes in liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2002;36:840-9.
7. Michalak S, Rousselet MC, Bedossa P, Pilette C, Chappard D, Oberti F, Gallois Y, Calés P. Respective role of porto-septal fibrosis and centrolobular fibrosis in alcoholic liver diseases. *J Pathol* 2003;201:55-62.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una patología hepática, en particular una fibrosis hepática en un sujeto que comprende el establecimiento de al menos una puntuación diagnóstica no invasiva de la fibrosis portal y septal mediante la realización de las etapas siguientes :
- 10 a) medir en una muestra de dicho sujeto tres, cuatro, cinco, seis o siete variables escogidas en el grupo constituido por α -2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico (AH o hialuronato), apolipoproteína AI (ApoAI), propéptido N-terminal del procolágeno de tipo III (P3P), gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT), bilirubina, gamma-globulinas (GLB), plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT), alanina amino-transferasa (ALAT), urea, sodio (NA), glicemia, triglicéridos, albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (PAL), YKL-40 (human cartilage glycoprotein 39), Inhibidor tisular de la metaloproteinasa de la matriz 1 (TIMP-1), metaloproteinasa de la matriz 2 (MMP-2), Ferritina, una al menos de las tres, cuatro, cinco, seis o siete variables que se escogen entre el grupo constituido por plaquetas (PLQ) y tasa de protrombina (TP); en el caso donde se mide exactamente tres variables, estas tres variables no pueden ser juntas plaquetas (PLQ), tasa de protrombina (TP) y bilirubina ; y, las tres, cuatro, cinco, seis o siete variables escogidas no comprenden juntas α -2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico (AH o hialuronato) e Inhibidor tisular de la metaloproteinasa de la matriz 1 (TIMP-1),
- 15 b) recoger al menos una variable clínica que caracteriza a dicho sujeto y ; para la puntuación diagnóstica de la fibrosis portal y septal, las etapas a) y b) arriba son tales que al menos se miden o recogen 4 variables,
- 20 c) combinar, en una función lógica o lineal, las variables siguientes : α -2 macroglobulina (A2M) y tasa de protrombina (TP) y al menos dos variables escogidas entre plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea, ácido hialurónico (AH) y edad, a fin de obtener un resultado diagnóstico de la fibrosis portal y septal;
- 25 d) diagnosticar la presencia y/o la gravedad de dicha patología y/o la eficacia de dicho tratamiento a partir del resultado obtenido durante la combinación de la etapa (c).
2. Método de acuerdo con las reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha patología hepática se escoge entre las enfermedades hepáticas de origen viral, las enfermedades hepáticas de origen alcohólico y las esteatosis.
- 30 3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** en la etapa (a) de dicho método, se mide en una muestra de dicho sujeto 4, 5, 6 o 7 variables.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** en la etapa (c) se combina :
- 35 - α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), ácido hialurónico (AH) y edad (marcador llamado SNIFF 4a) ;
- α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), aspartato amino-transferasa (ASAT) y edad (marcador llamado SNIFF 4b) ;
- 40 - α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT) y edad (marcador llamado SNIFF 5) ;
- α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea y ácido hialurónico (AH) (marcador llamado SNIFF 6) ; o
- 45 - α -2 macroglobulina (A2M), tasa de protrombina (TP), plaquetas (PLQ), aspartato amino-transferasa (ASAT), urea, ácido hialurónico (AH) y edad (marcador llamado SNIFF 7).
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicho sujeto es un hombre o una mujer.
- 50
- 55

Curva ROC SNIFF 7b°

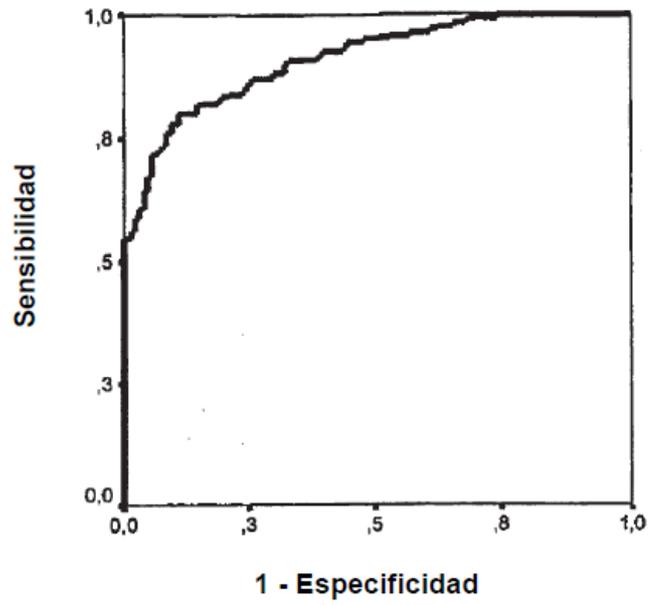


FIGURA 1

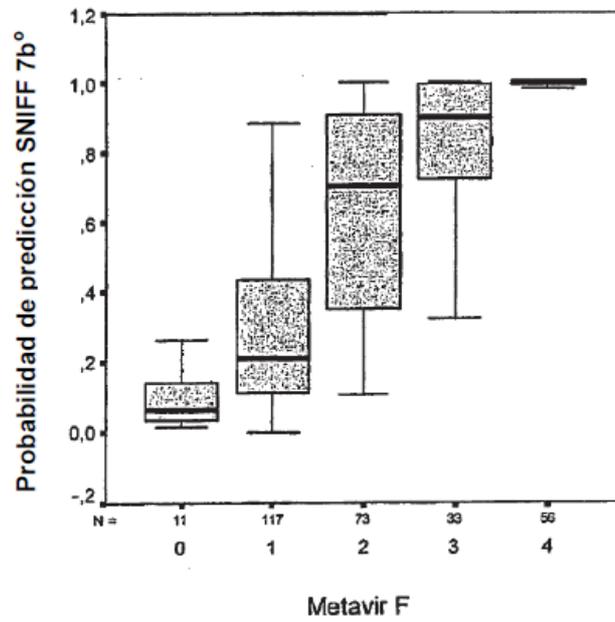


FIGURA 2

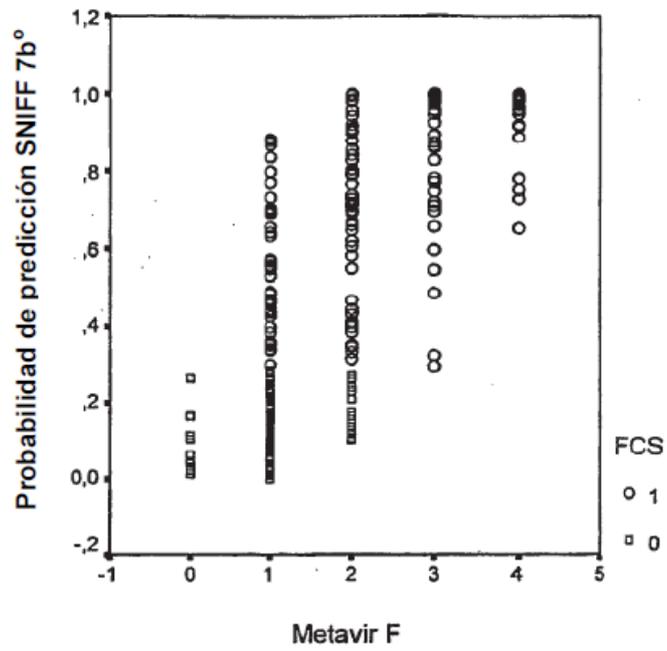


FIGURA 3

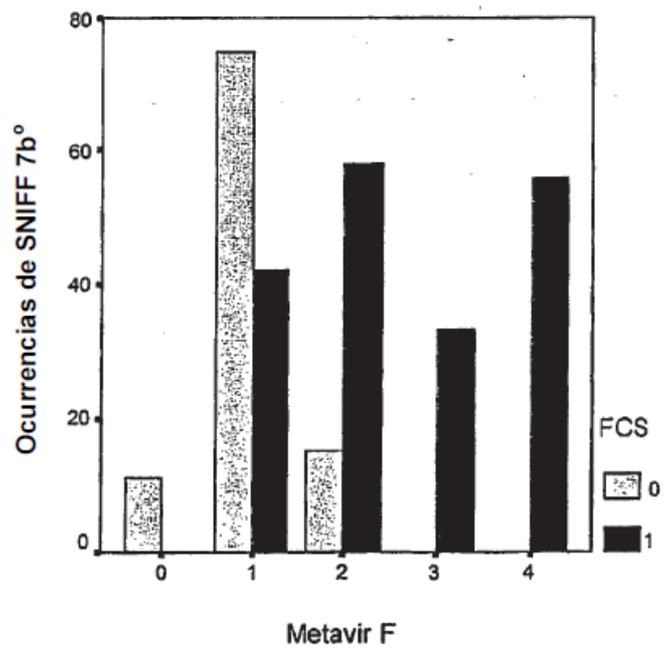


FIGURA 4

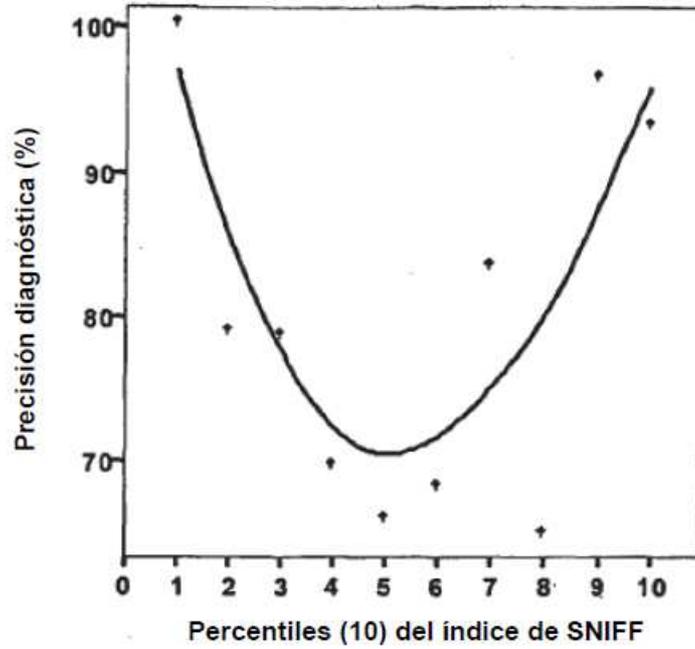


FIGURA 5

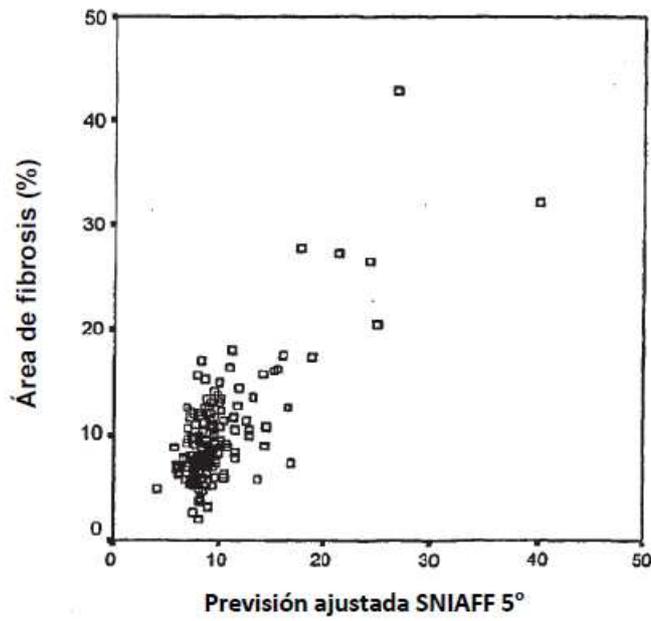


FIGURA 6

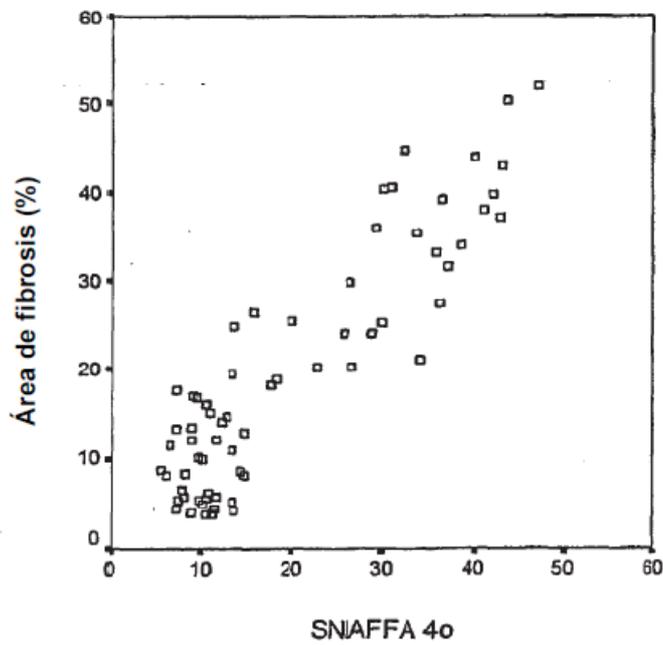
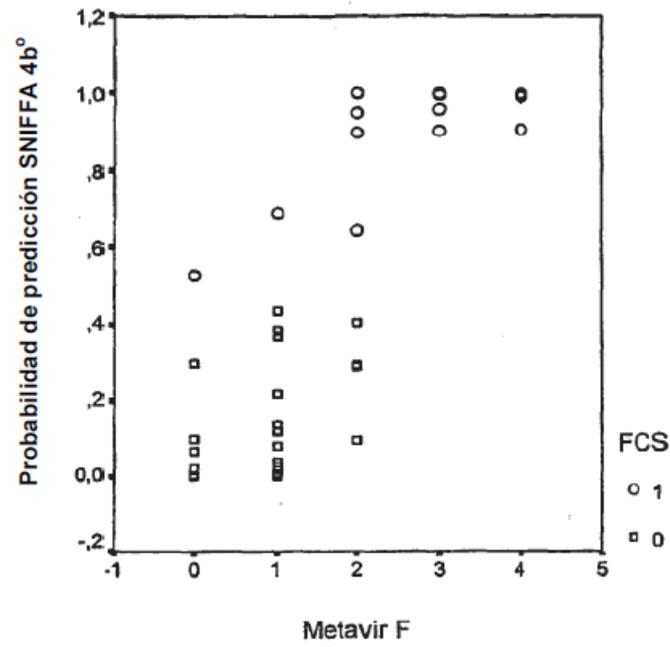


FIGURA 7

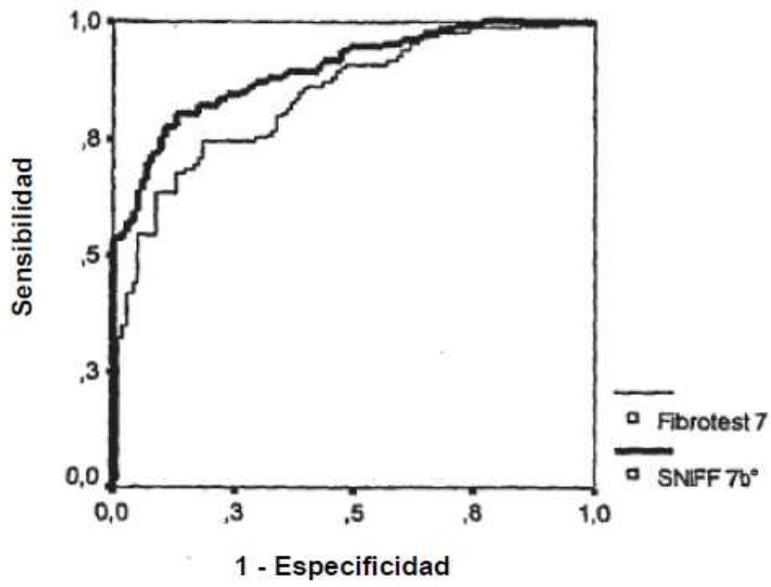


FIGURA 8

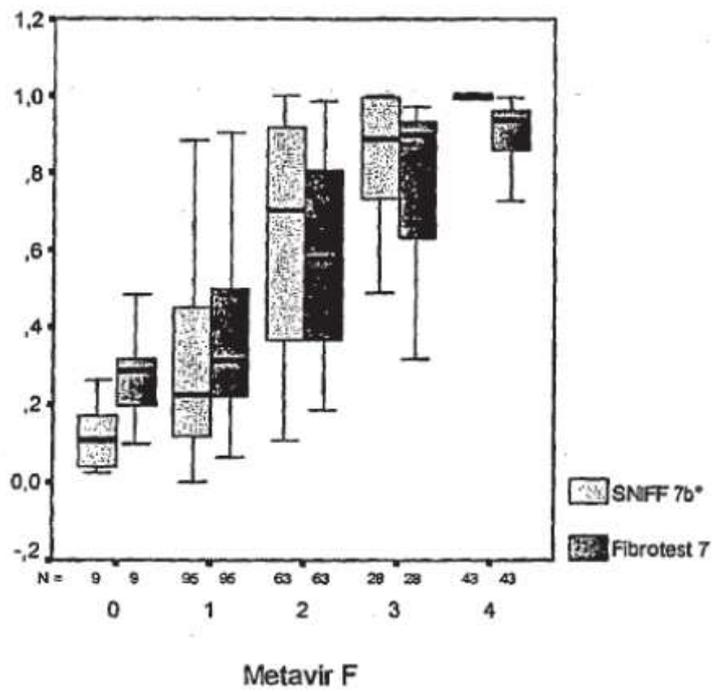


FIGURA 9