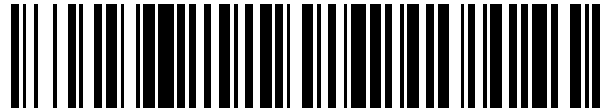


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 243**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007** **E 11174936 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014** **EP 2469283**

54 Título: **Diagnóstico clínico de una fibrosis hepática utilizando APOL1 de suero humano como biomarcador**

30 Prioridad:

08.09.2006 US 842980 P

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

25.04.2014

73 Titular/es:

**THE CHANCELLOR, MASTERS AND SCHOLARS
OF THE UNIVERSITY OF OXFORD (100.0%)
Wellington Square
Oxford OX1 2JD, GB**

72 Inventor/es:

**GANGADHARAN, BEVIN;
ZITZMANN, NICOLE y
DWEK, RAYMOND A.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 457 243 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

Diagnóstico clínico de una fibrosis hepática utilizando APOL1 de suero humano como biomarcador.

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere generalmente a procedimientos para diagnosticar una fibrosis hepática utilizando un panel de anticuerpos dirigidos contra un nuevo panel de biomarcadores de fibrosis. Estas nuevas proteínas también pueden servir como biomarcadores para hepatitis y carcinoma hepatocelular (HCC), así como dianas farmacéuticas para cicatrización hepática y HCC.

Antecedentes de la invención

15 Fibrosis hepática. La fibrosis hepática (fibrosis del hígado) es una respuesta de curación de heridas caracterizada por la acumulación excesiva de tejido cicatrizal (es decir, matriz extracelular) en el hígado. Los elementos estructurales normales de los tejidos son sustituidos por cantidades excesivas de tejido cicatrizal no funcional. La biopsia hepática con aguja es la herramienta principal para el diagnóstico y evaluación de fibrosis, aunque existe un número de limitaciones y desventajas bien documentadas para esta técnica, incluyendo malestar del paciente, dolor, hemorragia, y, en casos raros, muerte. Además, una biopsia puede ser poco fiable si la fibrosis no es homogénea por todo el hígado. La fibrosis hepática puede estar provocada por diversos factores, incluyendo alcohol y virus.

25 Cirrosis. La cirrosis hepática es la forma más grave de cicatrización del hígado, y, a diferencia de la fibrosis hepática, generalmente se considera que es irreversible y nodular. La cirrosis es la causa de alrededor de 6000 muertes cada año en el Reino Unido y aproximadamente 27.000 en los Estados Unidos de América, convirtiéndola en la novena causa principal de muerte (MacSween et al., (2002), Pathology of the Liver, 4ª Edición, Churchill Livingstone). La cirrosis es un factor de riesgo importante para HCC, y, en esta etapa de cáncer hepático, el único enfoque curativo es el trasplante de hígado. En el caso de cáncer hepático inducido víricamente, la cicatrización hepática y HCC pueden repetirse tras el trasplante. Es imperativo diagnosticar la fibrosis en las etapas tempranas de la cicatrización hepática reversible, de manera que se pueda evitar la cirrosis irreversible.

30 Virus de la hepatitis C. Aproximadamente 170 millones de personas en el mundo, es decir, 3% de la población mundial (véase, por ejemplo, OMS J. Viral. Hepat. 1999; 6: 35-47), y aproximadamente 4 millones de personas en los Estados Unidos de América están infectados con el virus de la hepatitis C (HCV, HepC). El HCV es de las causas principales de fibrosis y cirrosis hepáticas. Alrededor de 80% de los individuos infectados de forma aguda con HCV se convierten en infectados crónicamente. Por tanto, el HCV es una causa importante de hepatitis crónica. Una vez infectado crónicamente, el virus casi nunca se eliminará sin tratamiento. En casos raros, la infección por HCV provoca enfermedad clínicamente aguda, e incluso insuficiencia hepática. La infección crónica por HCV puede variar drásticamente entre individuos, en los que algunos tendrán enfermedad hepática clínicamente insignificante o mínima y nunca desarrollarán complicaciones, y otros tendrán hepatitis crónica clínicamente aparente y pueden continuar desarrollando fibrosis y cirrosis. Alrededor del 20% de los individuos con HCV que desarrollan cirrosis desarrollarán enfermedad hepática de estadio final y tendrán un mayor riesgo de desarrollar cáncer hepático primario.

45 Existe la necesidad de métodos mejorados para diagnosticar una fibrosis hepática y una cirrosis en pacientes.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para la detección de fibrosis.

50 En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para detectar fibrosis, que comprende: (a) determinar el nivel de al menos una apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y (b) comparar dicho nivel (a) con un nivel de control de dicha por lo menos una apolipoproteína L1 (Apo L1) a fin de determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis. Estos biomarcadores se pueden aplicar a cualquier enfermedad que presenten fibrosis, tal como fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, fibrosis pancreática, etc., pero en formas de realización específicas la fibrosis es fibrosis hepática. En otras formas de realización, la fibrosis incluye regulación diferencial de apolipoproteína L1 (Apo L1). En otras formas de realización, la muestra se toma de sangre, suero o plasma.

60 En otra forma de realización, la presente solicitud divulga un procedimiento para detectar un polipéptido asociado con HF, que comprende: a) aislar una muestra biológica de un paciente con fibrosis, b) aislar una muestra biológica de un paciente sin fibrosis, c) analizar las muestras de a) y b) usando 2D-PAGE, y d) comparar los resultados de 2D-PAGE para identificar polipéptidos con expresión diferencial entre pacientes con y sin fibrosis.

65 En otra forma de realización, la actual invención proporciona un procedimiento para evaluar la gravedad de la fibrosis, que comprende: a) determinar el nivel de al menos una apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y b) comparar dicho nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en dicha muestra

biológica del paciente con el nivel predeterminado de dicha apolipoproteína L1 (Apo L1) en una población de pacientes que oscilan desde sin fibrosis hasta cirrosis.

5 La presente solicitud también describe un kit útil para el pronóstico de la fibrosis, que comprende un agente asociado con HF en el que el agente detecta específicamente polipéptidos asociados con HF. En formas de realización específicas, el agente es un anticuerpo o su equivalente funcional que se une a polipéptidos asociados con HF. Estos anticuerpos se pueden usar para realizar un ensayo ELISA. El kit puede comprender además al menos una diana específicamente para detectar otro gen o producto génico útil como un indicador de pronóstico.

10 En otra realización, la actual invención proporciona un procedimiento para determinar el pronóstico de la fibrosis, que comprende: (a) determinar el nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y (b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicha apolipoproteína L1 (Apo L1) a fin de determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis.

15 **Breve descripción de los dibujos**

Figuras 1 a 4. Estas figuras muestran los cambios observados en la expresión de los nuevos biomarcadores principales. Cada imagen muestra una región aumentada del gel 2D-PAGE con la posición relativa de la proteína identificada con un círculo. Las imágenes de gel de suero representativas se muestran para individuos sanos y 20 pacientes con cirrosis.

Figura 1. Se muestra que la proteína semejante a antígeno CD5 está ausente en suero normal pero presente en suero de pacientes cirróticos.

25 Figura 2. Se muestra que la apolipoproteína L1 está presente en suero normal pero ausente en suero de pacientes cirróticos.

Figura 3. Cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina. Se encontró que este inhibidor se escindió en fragmentos de 35 y 70 kDa en muestras de suero de individuos normales. El suero de pacientes con cirrosis mostró 30 una ausencia del fragmento de 35 kDa y una expresión disminuida del fragmento de 70 kDa, sugiriendo una menor escisión de esta proteína.

Figura 4. Se muestra que la β 2 glucoproteína I está ausente en suero normal pero presente en suero de los 35 pacientes cirróticos.

Figura 5. Esta figura demuestra que la escisión de α 2 macroglobulina aumenta con la fibrosis. Las imágenes mostradas son imágenes aumentadas (como en las Figuras 1-4) pero muestran perfiles de manchas de suero de individuos sanos, pacientes con fibrosis leve, fibrosis moderada y cirrosis. U muestra α 2 macroglobulina sin escindir, H muestra la cadena pesada procedente de α 2 macroglobulina escindida, y L muestra la cadena ligera procedente 40 de α 2 macroglobulina escindida.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

45 La siguiente descripción perfila la invención resumida anteriormente. Sin embargo, la divulgación no está limitada a la metodología particular, protocolos, estirpes celulares, especies o géneros de animales, constructos y reactivos descritos, y como tal puede variar. Igualmente, la terminología usada en la presente memoria describe solamente formas de realización particulares, y no pretende limitar el alcance de la invención.

50 Se ha descubierto que diversas proteínas se expresan de forma diferencialmente en muestras de suero humano de pacientes con fibrosis/cirrosis inducida por HCV cuando se comparan con individuos sanos. Este descubrimiento se logró comparando estas muestras séricas usando una técnica que separa proteínas en dos dimensiones en una matriz de gel para proporcionar manchas discretas de proteínas.

55 Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el apreciado habitualmente por un experto ordinario pertinente.

a. Definiciones

60 Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases utilizados en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

Las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia plural excepto que el contexto dicte claramente otra cosa.

65 "β2GPI" se refiere a β2 glucoproteína I.

- “2D-PAGE” se refiere a electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional.
- “a2M” se refiere a $\alpha 2$ macroglobulina.
- 5 “ABTS” se refiere a ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
- “Apo L1” se refiere a apolipoproteína L1.
- 10 “BSA” se refiere a seroalbúmina bovina.
- “CD5L” se refiere a proteína semejante a antígeno CD5.
- “ELISA” se refiere a ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima.
- 15 “HCC” se refiere a carcinoma hepatocelular.
- “HCV” se refiere a virus de la hepatitis C.
- 20 “HF” se refiere a fibrosis hepática.
- “HRP” se refiere a peroxidasa de rábano picante.
- “kDa” se refiere a kilodalton.
- 25 “LFT” se refiere a ensayo de la función hepática.
- “PBS” se refiere a disolución salina tamponada con fosfato.
- 30 “PBS-T” se refiere a disolución de PBS que contiene Tween.
- “tPA” se refiere a activador de plasminógeno de tipo tisular.
- 35 “Muestra biológica” engloba una variedad de tipos de muestras obtenidos de un organismo que se puede usar en un ensayo de diagnóstico o de monitorización. La expresión engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como una muestra de biopsia, o cultivos tisulares o células derivadas de ellos y su progenie. Adicionalmente, la expresión puede englobar células tumorales u otras células circulantes. La expresión engloba específicamente una muestra clínica, e incluye además células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, orina, fluido amniótico, fluidos biológicos, y muestras tisulares. La expresión también engloba muestras que se han manipulado de cualquier forma después de su obtención, tal como el tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento de ciertos componentes.
- 40 “Secuencia biomolecular” o “secuencia” se refiere a toda o una porción de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica.
- 45 “BLAST” se refiere a herramienta de búsqueda de alineamiento local básica, una técnica para detectar subsecuencias sin saltos que coinciden con una secuencia de búsqueda dada. “BLASTP” es un programa BLAST que compara una secuencia de búsqueda de aminoácidos frente a una base de datos de secuencias proteicas. “BLASTX” es un programa BLAST que compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de búsqueda nucleotídica (ambas hebras) frente a una base de datos de secuencias proteicas.
- 50 “Cáncer”, “neoplasma”, y “tumor”, utilizados en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a células o tejidos que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Los procedimientos y composiciones de esta invención se aplican particularmente a células precancerosas (*es decir*, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas, y no metastásicas.
- 55 Una “fibrosis se caracteriza por la regulación diferencial de polipéptidos asociados con HF” se refiere a un sujeto con tejido que muestra cicatrización, y en el que una proteína asociada con HF tiene expresión diferencial.
- 60 “Fenotipo de fibrosis” se refiere a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula fibrótica. Los fenómenos pueden variar con el tipo de fibrosis, pero el fenotipo de fibrosis se identifica generalmente por anomalías en la formación de tejido cicatrizal.
- “Tipo celular” se refiere a una célula procedente de una fuente dada (por ejemplo, tejido u órgano), o a una célula en un estado dado de diferenciación, o a una célula asociada con una patología dada o composición genética.
- 65 “Complementario” se refiere a la compatibilidad topológica o emparejamiento de las superficies que interactúan de

una molécula sonda y su diana. La diana y su sonda se pueden describir como complementarios, y además las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí.

5 El término “detectable” se refiere a un patrón de expresión de polipéptido que se puede observar usando técnicas descritas en esta solicitud y que son bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, la expresión polipeptídica se puede “detectar” vía técnicas estándar, incluyendo inmunoensayos tales como transferencias Western.

10 “Diagnóstico” y “diagnosticar” incluyen generalmente una determinación de una susceptibilidad del sujeto a una enfermedad o trastorno, una determinación en cuanto a si un sujeto está actualmente afectado por una enfermedad o trastorno, un pronóstico de un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno (*por ejemplo*, identificación de estados cancerosos premetastásicos o metastásicos o fibrosis), y teramétrica (por ejemplo, monitorización de un estado del sujeto para proporcionar información en cuanto al efecto o eficacia de la terapia).

15 “Expresión diferencial” se refiere tanto a diferencias cuantitativas así como cualitativas en los patrones de expresión temporal y tisular de un gen. Por ejemplo, un gen expresado diferencialmente puede tener activada su expresión o completamente inactivada en estados normales frente a los enfermos. Tal gen regulado cualitativamente puede mostrar un patrón de expresión en un tejido dado, tipo celular, o en el suero/plasma del sujeto, que es detectable en estados de control o mórbidos, o detectable en ambos pero con expresión diferente. “Proteína expresada diferencialmente”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos que identifica de forma única una proteína expresada diferencialmente de manera que la detección de la proteína expresada diferencialmente en una muestra se correlaciona con la presencia de una proteína expresada diferencialmente en una muestra.

25 “Expresión” se refiere generalmente al proceso mediante el cual una secuencia polinucleotídica sufre transcripción y traducción exitosas de manera que se expresan niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o proteína. En ciertos contextos en la presente memoria, expresión se refiere a la producción de ARNm. En otros contextos, la expresión se refiere a la producción de proteína o sus fragmentos. Los fragmentos se pueden producir vía escisión enzimática o procesos biológicos característicos de estados normales o mórbidos.

30 Un “producto de expresión” o “producto génico” es una biomolécula, tal como una proteína o ARNm, que se produce cuando un gen en un organismo se transcribe o traduce o se modifica de forma postraduccional.

35 Un “fragmento de una proteína” se refiere a una porción de una proteína. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden comprender polipéptidos obtenidos digiriendo proteína de longitud completa aislada a partir de células cultivadas. En una realización, un fragmento proteico comprende al menos alrededor de 6 aminoácidos. En otra realización, el fragmento comprende al menos alrededor de 10 aminoácidos. En todavía otra forma de realización, el fragmento proteico comprende al menos alrededor de 16 aminoácidos.

40 En el contexto de esta solicitud, la expresión “equivalente funcional” se refiere a una proteína que posee características funcionales o estructurales que son sustancialmente similares a toda o parte de la proteína nativa asociada con HF. La expresión “equivalente funcional” pretende incluir los “fragmentos”, “mutantes”, “derivados”, “alelos”, “híbridos”, “variantes”, “análogos”, o “derivados químicos” de proteínas nativas asociadas con HF.

45 En el contexto de inmunoglobulinas, la expresión “equivalente funcional” se refiere a moléculas inmunoglobulínicas que muestran propiedades de unión inmunológica que son sustancialmente similares a la inmunoglobulina progenitora. “Propiedades de unión inmunológica” se refiere a interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica. De hecho, un equivalente funcional de una inmunoglobulina de anticuerpo monoclonal, por ejemplo, puede inhibir la unión del anticuerpo monoclonal progenitor a su antígeno. Un equivalente funcional puede comprender fragmentos F(ab')₂, moléculas F(ab), fragmentos Fv, variable de fragmento monocatenario presentada en fago (scFv), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos quiméricos, o similares, en tanto que la inmunoglobulina muestre las características de la inmunoglobulina progenitora.

50 La expresión “proteína de fusión” se refiere a una proteína compuesta de dos o más polipéptidos que, aunque no están unidos típicamente en su estado nativo, están unidos por sus términos amino y carboxilo respectivos a través de un enlace peptídico para formar un polipéptido continuo único. Se entiende que los dos o más componentes polipeptídicos se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente a través de un ligador/espaciador peptídico.

60 “Gen” se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante no interrumpida, o puede incluir uno o más intrones, unidos por las uniones de ajuste apropiadas. Además, un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones codificantes o en las regiones no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o a la estructura química del producto de expresión, la

velocidad de expresión, o la manera de controlar la expresión. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones, inserciones, supresiones, y sustituciones de uno o más nucleótidos. A este respecto, tales genes modificados se pueden denominar “variantes” del gen “nativo”.

5 “Expresión génica” se refiere al proceso mediante el cual una secuencia polinucleotídica sufre transcripción y traducción exitosas de manera que se expresan niveles detectables de la secuencia nucleotídica.

El término “homología”, como se usa aquí, se refiere a un grado de complementariedad. Puede existir homología parcial u homología total (*es decir*, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es aquella que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica para que no se hibride a un polinucleótido diana; se usa la expresión funcional “sustancialmente homóloga”. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana se puede examinar usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en disolución, y similar) en condiciones de baja restricción. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá e inhibirá la unión (*es decir*, la hibridación) de una secuencia o sonda completamente homóloga a la secuencia diana en condiciones de baja restricción. Esto no quiere decir que las condiciones de baja restricción son tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja restricción requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (*es decir*, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede ensayar mediante el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (*por ejemplo*, menos de alrededor de 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda secuencia diana no complementaria.

“Individuo”, “sujeto”, “hospedante”, y “paciente”, utilizados en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia. En una realización preferida, el individuo, sujeto, hospedante, o paciente es un ser humano. Otros sujetos pueden incluir, pero no se limitan a, ganado vacuno, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, primates, marmotas, patos, y ratones.

“Aislado” se refiere a un polinucleótido, un polipéptido, una inmunoglobulina, o una célula hospedante que está en un entorno diferente de aquel en el que aparece de forma natural el polinucleótido, el polipéptido, la inmunoglobulina, o la célula hospedante.

“Marcador” se refiere a agentes que son capaces de proporcionar una señal detectable, ya sea directamente o a través de la interacción con uno o más miembros adicionales de un sistema productor de señales. Los marcadores que son directamente detectables y pueden encontrar uso en la invención incluyen marcadores fluorescentes. Los fluoróforos específicos incluyen fluoresceína, rodamina, BODIPY, colorantes de cianina, y similares. La invención también contempla el uso de isótopos radioactivos, tales como ³⁵S, ³²P, ³H, y similares, como marcadores. También se pueden utilizar marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (*por ejemplo*, poliestireno, polipropileno, látex). Véanse, *por ejemplo*, las patentes US n^{os} 4.366.241; 4.277.437; 4.275.149; 3.996.345; 3.939.350; 3.850.752; y 3.817.837.

40 La expresión “condiciones fisiológicas normales” significa condiciones que están típicamente dentro de un organismo vivo o una célula. Aunque algunos órganos u organismos proporcionan condiciones extremas, el entorno intraorgánico e intracelular varía normalmente alrededor de pH 7 (*es decir*, de pH 6,5 a pH 7,5), contiene agua como el disolvente predominante, y existe a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La concentración de las diversas sales depende del órgano, organismo, célula, o compartimento celular usado como referencia.

“Polinucleótido” y “ácido nucleico”, utilizados en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos. De este modo, estos términos incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o de múltiples cadenas, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases purínicas y pirimidínicas u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales, o derivatizadas. Estos términos incluyen además, pero no se limitan a, ARNm o ADNc que comprende secuencias intrónicas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Como alternativa, la cadena principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditos, y de este modo puede ser un fosforamidato oligodesoxinucleosídico o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos, uracilo, otros azúcares, y grupos enlazantes tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones nucleotídicas. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar además tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluidos en esta definición son protecciones de los extremos, sustitución de uno o más de los oligonucleótidos de origen natural por un análogo, e introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes marcadores, otros polinucleótidos, o a un soporte sólido. El término “polinucleótido” también engloba ácidos nucleicos peptídicos. Los polinucleótidos pueden comprender además ADN genómico, ADNc, o híbridos de ADN-ARN.

“Polipéptido” y “proteína”, utilizados en la presente memoria de forma intercambiable, se refieren a una forma

- 5 polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, no traducidos, modificados químicamente, modificados bioquímicamente, y derivatizados. Un polipéptido o proteína puede ser de origen natural, recombinante, o sintético, o cualquier combinación de estos. Además, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o péptido de origen natural. Un polipéptido o proteína puede ser una única molécula o puede ser un complejo multimolecular. Además, tales polipéptidos o proteínas pueden tener cadenas principales peptídicas modificadas. Los términos incluyen proteínas de fusión, incluyendo proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina N-terminales, proteínas etiquetadas inmunológicamente, y similares.
- 10 “Predisposición” a una enfermedad o trastorno se refiere a una susceptibilidad del individuo a tal enfermedad o trastorno. Los individuos que son susceptibles es estadísticamente más probable que tengan cáncer o fibrosis, por ejemplo, en comparación con individuos normales/naturales.
- 15 Los términos “pronóstico” y “prognosis” se refieren al hecho o arte de predecir el transcurso de una enfermedad. Adicionalmente, los términos se refieren a la perspectiva de supervivencia y recuperación de una enfermedad según se anticipa a partir del transcurso habitual de esa enfermedad o se indica mediante rasgos especiales del caso individual. Además, los términos se refieren a la técnica o hecho de identificar una enfermedad a partir de sus pruebas y síntomas.
- 20 Las expresiones “indicador de pronóstico” o “indicador” se refieren a cualquier hecho que pueda servir como, o se refiera a, una base para un pronóstico. Estos términos se refieren además a cualesquiera bases de un diagnóstico diferencial, incluyendo los resultados del ensayo y caracterización de la expresión génica como se describe en la presente memoria, y la distinción de una enfermedad o afección de otras que presentan síntomas similares. Adicionalmente, los términos “indicador” o “indicador de pronóstico” se refieren a cualesquiera bases, incluyendo los resultados de ensayo y caracterización de la expresión génica como se describe en la presente memoria, que se pueden usar para distinguir el transcurso probable de una enfermedad maligna.
- 25 “Agente de captura de proteína” se refiere a una molécula o a un complejo multimolecular que puede unir una proteína a sí misma. En una realización, los agentes de captura de proteína se unen a sus parejas de unión de una manera sustancialmente específica. En otra realización, los agentes de captura de proteína pueden mostrar una constante de disociación (KD) menor que alrededor de 10^{-6} . El agente de captura de proteína puede comprender una biomolécula tal como una proteína o un polinucleótido. La biomolécula puede comprender además una biomolécula de origen natural, recombinante, o sintética. Los ejemplos de agentes de captura de proteína incluyen inmunoglobulinas, antígenos, receptores, u otras proteínas, o sus porciones o fragmentos. Además, se entiende que los agentes de captura de proteína no están limitados a agentes que sólo interaccionan con sus parejas de unión a través de interacciones no covalentes. En su lugar, los agentes de captura de proteína también se pueden unir de forma covalente a las proteínas con las que se unen. Por ejemplo, el agente de captura de proteína se puede fotorreticular a su pareja de unión tras la unión.
- 30 “Identidad de secuencia” se refiere a un grado de similitud o complementariedad. Puede haber identidad parcial o identidad total. Una secuencia parcialmente complementaria es aquella que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica de hibridarse a un polinucleótido diana. Se usa el término funcional “sustancialmente idéntica”. La inhibición de la inhibición de la secuencia totalmente complementaria a la secuencia diana se puede examinar usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en disolución, y similar) en condiciones de baja restricción. Una secuencia o sonda sustancialmente idéntica competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia o sonda totalmente idéntica a la secuencia diana en condiciones de baja restricción. Esto no quiere decir que las condiciones de baja restricción son tales que se permite la unión no específica; las condiciones de baja restricción requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede ensayar mediante el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, identidad menor que alrededor de 30%); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda secuencia diana no complementaria.
- 40 Otra manera de considerar la identidad de secuencia en el contexto de dos secuencia de ácidos nucleicos o polipeptídicas incluye la referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean en busca de la máxima correspondencia a lo largo de una región específica. Como se usa en la presente memoria, porcentaje de identidad de secuencia significa el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, saltos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.
- 55 “Condiciones restrictivas” se refiere a condiciones en las que una sonda se puede hibridar a su secuencia

polinucleotídica diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia (por ejemplo, secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas). Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a la fuerza iónica definida y pH. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH, y concentración de polinucleótido) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es al menos alrededor de 0,01 a alrededor de 1,0 M de la concentración de iones sodio (u otras sales) a alrededor de pH 7,0 a alrededor de pH 8,3 y la temperatura es al menos alrededor de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

“Sustancialmente purificado” se refiere a un compuesto que se elimina de su entorno natural y está al menos alrededor de 60% libre, al menos alrededor de 65% libre, al menos alrededor de 70% libre, al menos alrededor de 75% libre, al menos alrededor de 80% libre, al menos alrededor de 83% libre, al menos alrededor de 85% libre, al menos alrededor de 88% libre, al menos alrededor de 90% libre, al menos alrededor de 91% libre, al menos alrededor de 92% libre, al menos alrededor de 93% libre, al menos alrededor de 94% libre, al menos alrededor de 95% libre, al menos alrededor de 96% libre, al menos alrededor de 97% libre, al menos alrededor de 98% libre, al menos alrededor de 99% libre, al menos alrededor de 99,9% libre, o al menos alrededor de 99,99% o más libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural.

Una “proteína diana” se refiere a un polipéptido, a menudo derivado de una muestra biológica, al que se hibrida o une específicamente un agente de captura de proteína. Es la presencia o ausencia de la proteína diana lo que se ha de detectar, o la cantidad de la proteína diana lo que se ha de cuantificar. La proteína diana tiene una estructura que es reconocida por el agente de captura de proteína correspondiente dirigido hacia la diana. La proteína o aminoácido diana también se puede referir a la subestructura específica de una proteína más grande a la que se dirige el agente de captura de proteína, o a la estructura global (por ejemplo, gen o ARNm) cuyo nivel de expresión se desea detectar.

Los términos “tratamiento”, “tratando”, “tratar”, y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o su síntoma, y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización parcial o total o cura para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad o síntoma aparezca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que aún no ha sido diagnosticado como que lo tiene; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

b. Polipéptidos asociados con HF

En un aspecto, la divulgación se refiere a “polipéptidos asociados con HF”, que incluye polipéptidos cuya expresión diferencial está asociada con fibrosis hepática. Los polipéptidos asociados con HF también incluyen variantes de las proteínas de origen natural, en el que tales variantes son idénticas o sustancialmente similares a la proteína de origen natural. En general, los polipéptidos variantes tienen una secuencia que tiene al menos alrededor de 80%, habitualmente al menos alrededor de 90%, y más habitualmente al menos alrededor de 98% de identidad de secuencia con un polipéptido asociado con HF descrito en la presente memoria, según se mide mediante BLAST. Los polipéptidos variantes pueden estar glucosilados de forma natural o de forma no natural.

En general, las variantes de los polipéptidos asociados con HF descritos en la presente memoria tienen una identidad de secuencia mayor que al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 83%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 88%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 91%, al menos alrededor de 92%, al menos alrededor de 93%, al menos alrededor de 94%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99%, al menos alrededor de 99,9% o pueden ser mayor que al menos alrededor de 99,99%, según se determina mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como BLAST.

En una realización, un polipéptido variante asociado con HF puede ser un polipéptido mutante. Las mutaciones en el polipéptido asociado con HF pueden resultar de, pero no se limitan a, sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales. En general, las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas que conservan la carga general, la hidrofobia, la hidrofilia, y/o el volumen estérico del aminoácido sustituido.

En algunos polipéptidos mutantes asociados con HF, los aminoácidos se pueden sustituir para alterar un sitio de fosforilación o un sitio de acetilación.

De forma importante, los polipéptidos variantes se pueden diseñar para retener o para que tengan actividad biológica potenciada de una región particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional y/o, cuando el polipéptido es un miembro de una familia de proteínas, una región asociada con una secuencia de consenso). La selección de las alteraciones de los aminoácidos para la producción de variantes se puede basar en la accesibilidad (interior frente a exterior) del aminoácido, la termoestabilidad del polipéptido variante, los sitios de glucosilación deseados, los puentes de disulfuro deseados, los sitios de unión a metal deseados, y las sustituciones deseadas en bucles de prolina. Las mutéínas sin cisteína se pueden producir como se describe en la patente US nº 4.959.314.

Las variantes también incluyen fragmentos de los polipéptidos asociados con HF descritos en la presente memoria, particularmente fragmentos biológicamente activos y fragmentos que corresponden a dominios funcionales. Los fragmentos de interés tendrán típicamente una longitud de al menos alrededor de 10 aa a al menos alrededor de 15 aa, habitualmente una longitud de al menos alrededor de 50 aa, y pueden ser tan largos como 300 aa en longitud o mayores. Las variantes proteicas descritas en la presente memoria están codificadas por polinucleótidos.

Los polipéptidos asociados con HF de la divulgación se proporcionan en un entorno que no se produce de forma natural, *por ejemplo* están separados de su entorno de origen natural. En ciertas formas de realización, la proteína asociada con HF está presente en una forma sustancialmente purificada.

c. Agentes asociados con HF: Moduladores y parejas de unión

En otro aspecto, la divulgación proporciona un "agente asociado con HF", que se refiere a una clase de moléculas que consisten en "parejas de unión de polipéptidos asociados con HF".

Las parejas de unión de polipéptidos asociados con HF son moléculas que se unen a polipéptidos asociados con HF. Las parejas de unión de polipéptidos ejemplares son inmunoglobulinas. Las parejas de unión pueden modular, pero no es necesario, la actividad biológica de un polipéptido asociado con HF.

d. Inmunoglobulinas

Los agentes asociados con HF usados para identificar proteínas asociadas con HF incluyen inmunoglobulinas y equivalentes funcionales de inmunoglobulinas que se unen específicamente a polipéptidos asociados con HF. Los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" se usan en la presente memoria de forma intercambiable y en su sentido más amplio. De este modo, engloban anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada. En una realización, las presentes inmunoglobulinas comprenden al menos un dominio constante humano. En otra realización, las inmunoglobulinas del agente asociado con HF comprenden un dominio constante que muestra al menos alrededor de 90-95% de identidad de secuencia con un dominio constante humano y aún retiene la función efectora humana. Un agente asociado con HF inmunoglobulínico o su equivalente funcional puede ser humano, quimérico, humanizado, murino, injertado en CDR, presentado por fago, presentado por bacteria, presentado por levadura, producido por ratón transgénico, mutagenizado, y aleatorizado.

i. Anticuerpos en general

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" comprenden anticuerpos completamente ensamblados y fragmentos de anticuerpo que se pueden unir a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, dianticuerpos), incluyendo anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpos. Preferiblemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos son quiméricas, humanas, o humanizadas.

Los dominios variables de la cadena pesada y ligera reconocen o se unen a un epítipo particular de un antígeno cognado. El término "epítipo" se usa para referirse a los sitios de unión específica o determinante antigénico en un antígeno que se une al extremo variable de la inmunoglobulina. Los epítipos pueden ser lineales, es decir, pueden estar compuestos de una secuencia de restos de aminoácidos encontrada en la secuencia primaria asociada con HF. Los epítipos también pueden ser conformacionales, de manera que una inmunoglobulina reconoce una estructura tridimensional encontrada en una molécula plegada asociada con HF. Los epítipos también pueden ser una combinación de elementos lineales y conformacionales. Además, las porciones de hidratos de carbono de una molécula, como se expresan mediante las células diana que poseen tumor, también pueden ser epítipos.

Se afirma que las inmunoglobulinas se "unen específicamente" si: 1) muestran un nivel umbral de actividad de unión, y/o 2) no reaccionan significativamente de forma cruzada con moléculas polipeptídicas relacionadas conocidas. La afinidad de unión de una inmunoglobulina se puede determinar fácilmente por un experto ordinario en la materia, por ejemplo mediante análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949). En algunas formas de realización, las inmunoglobulinas de la presente divulgación se unen a proteínas asociadas con HF al menos 10³, más preferiblemente 10⁴, más preferiblemente al menos 10⁵, e incluso más preferiblemente al menos 10⁶ veces mayor que a otras proteínas.

ii. Anticuerpos policlonales y monoclonales

Las inmunoglobulinas divulgadas en la presente memoria pueden ser policlonales o monoclonales, y se pueden producir por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en esta técnica.

Los anticuerpos policlonales se provocan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc), intraperitoneales (ip) o intramusculares (im) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Además, se usan de forma adecuada agentes agregantes tales como alumbre y otros para potenciar la respuesta inmunitaria.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por cuanto se pueden sintetizar mientras no se contaminan por otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante el procedimiento de hibridoma o mediante los procedimientos de ADN recombinante. Los agentes asociados con HF de anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de librerías de anticuerpos de fagos.

iii. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Las inmunoglobulinas o anticuerpos que se unen a polipéptidos asociados con HF pueden ser "quiméricos" en el sentido de que una región variable puede proceder de una especie, tal como un roedor, y la región constante puede proceder de una segunda especie, tal como un ser humano.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos que se unen a proteínas asociadas con HF son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos procedentes de una región hipervariable del receptor están sustituidos por restos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región del marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante.

En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. En una realización, los anticuerpos humanizados comprenden una FR humanizada que muestra al menos 65% de identidad de secuencia con una FR aceptora (no humana), por ejemplo FR murina. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), particularmente una inmunoglobulina humana.

En la técnica se han descrito procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente, que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "de importación", que se toman típicamente de un dominio variable "de importación". La humanización se puede realizar esencialmente sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos humanizados son quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable, y posiblemente algunos restos de FR, están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en la obtención de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad.

Otros procedimientos implican generalmente conferir afinidad de unión a CDR donante sobre un marco de región variable aceptora de anticuerpo. Un procedimiento implica injertar y optimizar simultáneamente la afinidad de unión de un fragmento de unión de región variable. Otro procedimiento se refiere a optimizar la afinidad de unión de una región variable de anticuerpo.

iv. Fragmentos de anticuerpo

"Fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente su región variable o de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv,

dianticuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

5 La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual. Los fragmentos Fab también contienen el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada.

10 El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de reticular al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el término carboxílico del dominio de la cadena pesada CHI, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes poseen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica.

15 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento a antígeno y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación no covalente fuerte. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión.

20 Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. El polipéptido Fv puede comprender además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Véase PLUCKTHUN, 113 THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES 269-315 (Rosenburg and Moore eds. 1994). Véanse también el documento WO 93/16185; las patentes US n^{os} 5.587.458 y 5.571.894.

25 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaron vía digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células hospedantes recombinantes.

v. Conjugación y marcaje

30 Los anticuerpos antiproteína asociada con HF se pueden administrar en su forma "desnuda" o no conjugada, o pueden tener conjugados otros agentes a ellos.

35 Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar en forma detectablemente marcada. Los anticuerpos se pueden marcar detectablemente mediante el uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), marcadores fluorescentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Los procedimientos para lograr tal marcaje son bien conocidos en la técnica.

vi. Anticuerpos biespecíficos

40 Los anticuerpos biespecíficos de la invención son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Cada fragmento comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

45 Los procedimientos para obtener anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera inmunoglobulínicas, en el que las dos cadenas tienen especificidades diferentes.

50 En otro enfoque, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. Específicamente, los dominios variables se fusionan con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la región bisagra, de la región CH2 y de la región CH3. En una realización, la proteína de fusión comprende la primera región constante de cadena pesada (CHI) debido a que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera. Los polinucleótidos que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se pueden insertar en

5 vectores de expresión separados y se pueden cotransfectar en un organismo hospedante adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en formas de realización cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado rendimientos elevado o cuando las relaciones no tienen significancia particular.

10 Los anticuerpos biespecíficos también se han producido usando cremalleras de leucina y dímeros de Fv monocatenario (sFv).

e. Diagnóstico, pronóstico y evaluación de la terapia de fibrosis

15 En otro aspecto, por lo tanto, la divulgación proporciona procedimientos para usar los polipéptidos asociados con HF descritos en la presente memoria para diagnosticar y pronosticar fibrosis. En formas de realización no limitativas específicas, los procedimientos son útiles para detectar polipéptidos asociados con HF en células o suero/plasma, facilitando el diagnóstico de la fibrosis y la gravedad de una fibrosis en un sujeto, facilitando una determinación del pronóstico del sujeto, determinando la susceptibilidad a la fibrosis en un sujeto, y evaluando la sensibilidad del sujeto a la terapia (*por ejemplo*, proporcionando una medida del efecto terapéutico, *por ejemplo*, evaluando la carga tumoral durante o tras un régimen quimioterapéutico). Tales procedimientos pueden implicar la detección de niveles de polipéptidos asociados con HF en una muestra biológica de un paciente, *por ejemplo* suero/plasma, o un tejido o célula fibrótico sospechoso o potencial. Los procedimientos de detección pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*, en células aisladas, o en tejidos completos o un fluido corporal, *por ejemplo* sangre, plasma, suero, orina, y similar. En una realización, los polipéptidos asociados con HF se pueden usar para detectar y evaluar la fibrosis. Estos biomarcadores se pueden aplicar a cualquier enfermedad que presente fibrosis, tal como fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, fibrosis pancreática, etc., pero más preferiblemente la fibrosis es fibrosis hepática.

30 f. Detectando un polipéptido asociado con HF

Se proporcionan procedimientos para detectar en suero un polipéptido asociado con HF. Para la detección se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoensayo, usando anticuerpo específico para el polipéptido codificado, *por ejemplo* mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y similar, y ensayos funcionales para el polipéptido codificado, *por ejemplo*, actividad biológica.

40 Como apreciará el experto en la materia a partir de la presente memoria descriptiva, los procedimientos de detección y otros procedimientos descritos en la presente memoria pueden variar fácilmente. Tales variaciones están dentro del alcance pretendido de la invención. Por ejemplo, en el esquema de detección anterior, la sonda para uso en la detección se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y la muestra de ensayo se puede poner en contacto con la sonda inmovilizada. La unión de la muestra de ensayo a la sonda se puede detectar entonces de muchas maneras, *por ejemplo* detectando un marcador detectable unido a la muestra de ensayo para facilitar la detección de complejos de muestra de ensayo-sonda inmovilizada.

45 La divulgación proporciona además procedimientos para detectar la presencia de y/o medir un nivel de polipéptido asociado con HF en una muestra biológica, usando un anticuerpo específico para polipéptidos asociados con HF. Específicamente, el procedimiento para detectar la presencia de polipéptidos asociados con HF en una muestra biológica puede comprender la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal y detectar la unión del anticuerpo con el polipéptido asociado con HF en la muestra. Más específicamente, el anticuerpo se puede marcar para producir una señal detectable usando compuestos que incluyen, pero no se limitan a, un radiomarcador, una enzima, un cromóforo y un fluoróforo.

55 La detección de la unión específica de un anticuerpo específico para polipéptido asociado con HF, o un equivalente funcional del mismo, cuando se compara con un control adecuado, es una indicación de que los polipéptidos asociados con HF están presentes en la muestra. Los controles adecuados incluyen una muestra que se sabe que no contiene polipéptidos asociados con HF, y una muestra que se pone en contacto con un anticuerpo no específico para el polipéptido codificado, *por ejemplo* un anticuerpo antiidiotipo. En la técnica se conoce una variedad de procedimientos para detectar interacciones específicas de anticuerpo-antígeno, y se pueden usar en el procedimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos inmunohistológicos estándar, inmunoprecipitación, un inmunoensayo enzimático, y un radioinmunoensayo. En general, el anticuerpo específico se marcará de forma detectable, ya sea directa o indirectamente. Los marcadores directos incluyen radioisótopos; enzimas cuyos productos son detectables (*por ejemplo*, luciferasa, 3-galactosidasa, y similares); marcadores fluorescentes (*por ejemplo*, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, y similares); metales que emiten fluorescencia (*por ejemplo*, ¹¹²Eu, u otros de la serie de los lantánidos, unidos al anticuerpo mediante grupos quelantes de metales tales como EDTA); compuestos quimioluminiscentes (*por ejemplo*, luminol, isoluminol, sales de acridinio, y similares); compuestos bioluminiscentes (*por ejemplo*, luciferina, aecuarina (proteína fluorescente verde, y similares).

El anticuerpo se puede unir (acoplar) a un soporte insoluble, tal como una placa de poliestireno o una perla. Los marcadores indirectos incluyen segundos anticuerpos específicos para anticuerpos específicos para el polipéptido codificado ("primer anticuerpo específico"), en el que el segundo anticuerpo está marcado como se describe anteriormente; y miembros de pares de unión específica, *por ejemplo* biotina-avidina, y similares. La muestra biológica se puede poner en contacto con y se puede inmovilizar sobre un soporte sólido o portador, tal como nitrocelulosa, que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares, o proteínas solubles. El soporte se puede lavar entonces con tampones adecuados, seguido de la puesta en contacto con un primer anticuerpo específico marcado de forma detectable. En la técnica se conocen los procedimientos de detección, y se escogerán como apropiados para la señal emitida por el marcador detectable. La detección se logra generalmente en comparación con controles adecuados y con patrones apropiados.

g. Kits

Los procedimientos de detección se pueden proporcionar como parte de un kit. De este modo, se describen kits para detectar la presencia y/o un nivel de un polipéptido asociado con HF en una muestra biológica. Los procedimientos que usan estos kits se pueden llevar a cabo mediante laboratorios químicos, laboratorios experimentales, médicos, o personas privadas. Los kits para detectar un polipéptido asociado con HF que se expresa diferencialmente durante la fibrosis. El kit puede proporcionar componentes adicionales que son útiles en procedimientos, incluyendo, pero sin limitarse a, tampones, reactivos de desarrollo, marcadores, superficies reaccionantes, medios para detección, muestras de control, patrones, instrucciones, e información interpretativa.

Ejemplos

Proteínas expresadas diferencialmente establecidas cuando se compara suero procedente de individuos sanos normales con pacientes con fibrosis/cirrosis

Se ha descubierto que diversas proteínas se expresan diferencialmente en muestras de suero humano de pacientes con fibrosis/cirrosis inducida por HCV cuando se comparan con individuos sanos Gangadharan et al., (2007), Clin. Chem., 53. Este descubrimiento se logró comparando estas muestras de suero usando electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), una técnica que separa proteínas en dos dimensiones en una matriz de gel para dar manchas discretas de proteína. Este es el primer uso de un enfoque de 2D-PAGE para identificar biomarcadores séricos para fibrosis.

Ejemplo 1

Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE)

Para identificar biomarcadores para diferentes etapas de fibrosis inducida por HCV, se analizaron muestras de suero de individuos sanos y de pacientes con fibrosis/cirrosis inducida por HCV (15 individuos) en un estudio proteómico basado en 2D-PAGE. Se separaron mediante carga 500 µg de proteínas séricas usando un gradiente no lineal de pH 3-10 en la primera dimensión del gel, y mediante peso molecular (tamaño) en la segunda dimensión. La electroforesis, tinción fluorescente y barrido de los geles se realizó como se describe por Gangadharan et al., (2007), Clin. Chem., 53.

Ejemplo 2

Análisis de imágenes diferencial e identificación de proteínas

La matriz de manchas bidimensional generada se comparó entre muestras de suero normales y con fibrosis/cirrosis mediante análisis de imágenes asistido por ordenador. Las imágenes barridas de todos los geles 2D-PAGE se analizaron mediante análisis de imágenes asistido por ordenador, como se describe por Gangadharan et al., (2007), Clin. Chem., 53. Los cambios expresados diferencialmente que fueron mayores que o iguales a 2 veces diferentes se consideraron significativos. Se cortó un total de 53 rasgos expresados diferencialmente, se digirió con tripsina y se analizó mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 3

Identificación de biomarcadores de suero humano para fibrosis hepática debido a cirrosis

El análisis de imágenes diferencial reveló pruebas iniciales de biomarcadores séricos potenciales. Véanse las figuras 1-5. Los cambios más prominentes se observaron cuando se comparan muestras séricas procedentes de pacientes cirróticos con controles sanos. Este análisis mostró que la expresión de los fragmentos de la cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina (ITIH4), α 1 antiqumiotripsina, apolipoproteína L1 (Apo L1), prealbúmina y albúmina disminuyó en suero cirrótico, mientras que la expresión de proteína semejante a antígeno CD5 (CD5L) y β 2 glucoproteína I (β 2GPI) aumentó. En general, los componentes de α 2 macroglobulina (α 2M) e inmunoglobulínicos aumentó con la fibrosis hepática, mientras que las cadenas α 1, α 2 y β de haptoglobina y componentes del

complemento (C3, C4 y proteína 1 relacionada con el factor H) disminuyeron.

Pacientes con cirrosis	
Disminuye	Aumenta
fragmentos de cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina	proteína semejante a antígeno CD5 (CD5L)
α 1 antiqumiotripsina	β 2 glucoproteína I (β 2GPI)
apolipoproteína L1 (Apo L1)	
prealbúmina y albúmina	
cadena α 1, α 2 y β de haptoglobina y componentes del complemento (C3, C4 y proteína 1 relacionada con el factor H)	α 2 macroglobulina (a2M) y componentes inmunoglobulínicos

Ejemplo 4

5 Identificación de biomarcadores de suero humano para fibrosis hepática debido a fibrosis inducida por HCV

A partir del análisis de imágenes diferencial se identificaron nuevas proteínas asociadas con fibrosis inducida por HCV. La Tabla 1 proporciona un resumen de proteínas seleccionadas expresadas diferencialmente que se han clasificado según su función. Estas proteínas incluyen los fragmentos de la cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina, la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento, CD5L, Apo L1, y β 2GPI. También se detectó la mayor y menor escisión de tioréster de a2M y Complemento C3, respectivamente. Aunque β 2GPI es un nuevo biomarcador para cirrosis hepática, ya se ha observado en cáncer hepático mediado por el virus de la hepatitis B (HBV) (Drake et al., (2006), Mol Cell Proteomics). La disminución en el Complemento C3 también se ha observado en cáncer hepático mediado por HBV (Steel et al., (2003), Proteomics, 3, 601). Estas nuevas proteínas también pueden servir como biomarcadores para hepatitis y HCC así como dianas farmacéuticas para fibrosis hepática, por ejemplo el nuevo biomarcador, cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina, es escindido por calicreína, un activador aguas abajo del activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA). Se sabe que el tPA es estimulado por fármacos usados actualmente en terapia antifibrótica (Nagaoka et al., (2003), Liver Int, 23, 476; Rimola, (2003), Am J Transplan, 5, 433).

Pacientes con fibrosis inducida por HCV	
Disminuye	Aumenta
fragmentos de la cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina	CD5L
proteína 1 relacionada con el factor H del complemento	β 2GPI
Apo L1	
escisión de tioréster del Complemento C3	escisión de tioréster de a2M

Ejemplo 5

25 La medida de estas nuevas proteínas en suero ayudará al diagnóstico fiable tanto de fibrosis como de cirrosis, lo que puede eliminar la necesidad de biopsia hepática. Estas medidas se pueden lograr usando un inmunoensayo con anticuerpos dirigidos contra estas proteínas.

30 En el caso de proteínas que tienen escisión alterada, es decir, a2M, y cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina, el grado de escisión se puede establecer usando anticuerpos de unión N y C-terminales. Un anticuerpo contra la región de escisión puede determinar los niveles de un biomarcador no escindido. Para a2M, se pueden usar dos anticuerpos diferentes: 1) anticuerpos dirigidos al extremo N-terminal de a2M antes del sitio de escisión de tioréster para el fragmento más grande; y 2) anticuerpos dirigidos al extremo C-terminal de a2M después del sitio de escisión para el fragmento más pequeño. Se pueden usar dos anticuerpos diferentes en el caso de la cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina: 1) anticuerpos dirigidos contra la cadena grande de 70 kDa; y 2) anticuerpos dirigidos contra la cadena pequeña de 35 kDa. Actualmente no parece que existan anticuerpos comercialmente disponibles contra la región del sitio de tioréster de a2M o el péptido activo de la cadena pesada H4 de inhibidor de inter- α -tripsina donde se produce la escisión. El anticuerpo contra la región de escisión puede ayudar a determinar de forma más fiable los niveles de los biomarcadores intactos y escindidos.

Ejemplo 6

45 Se puede formular una escala de puntuación de fibrosis para cada uno de los nuevos marcadores. Se determina la concentración media de estos biomarcadores en suero a lo largo de las diversas etapas de la fibrosis hepática. Actualmente se usa una escala de 0 a 6 para evaluar la fibrosis hepática en el hospital, en la que 0 representa sin fibrosis, 1-5 representa las etapas intermedias de fibrosis aumentando de severidad desde leve a moderada/grave, y 6 es cirrosis (Ishak, (1995), J Hepatol, 22, 696). Determinando los intervalos de concentración de los nuevos biomarcadores a lo largo de estas siete etapas, se puede asignar un sistema de puntuación similar de 0 a 6. Los

resultados aditivos a partir de las puntuaciones de todos los nuevos biomarcadores indican de manera más fiable del grado de fibrosis que el examen de los biomarcadores individuales.

Ejemplo 7

5 Ensayo ELISA

10 Para medir los nuevos biomarcadores de fibrosis se usa un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Este es un ensayo llevado a cabo en formato de placa de 96 pocillos. Una opción es usar el ELISA de unión de un sitio no competitivo. En este ensayo, se preparan concentraciones conocidas de antígeno (en este ejemplo, los nuevos biomarcadores y muestras de suero) en un tampón de bicarbonato, se añaden a la placa de 96 pocillos y se incuban toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron entonces tres veces con una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween (PBS-T), seguido del bloqueo con una disolución PBS que contiene seroalbúmina bovina (BSA). Tras incubarse a 37°C durante 1 hora, se añade un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno (en este ejemplo, el biomarcador de interés), la placa se incuba a 37°C durante 1 hora y después se lava tres veces con PBS-T. Entonces se añade un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), dirigido contra el origen animal del anticuerpo primario, y la placa se incuba a 37°C durante 1 hora seguido de tres lavados con PBS-T. Finalmente, se añade a cada pocillo un sustrato de peroxidasa tal como ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), y la absorbancia se lee en un lector de placas a 405 nm después de 30 minutos.

20 Como alternativa, se puede usar un ELISA de sándwich. En este tipo de ensayo, un anticuerpo se une al fondo de un pocillo de una placa. Se añade el antígeno, en este caso la proteína biomarcadora, y los productos no unidos se eliminan por lavado. Entonces se añade un segundo anticuerpo marcado, que se une al antígeno. La cantidad de anticuerpo secundario unido se cuantifica, habitualmente de forma colorimétrica. Además de los nuevos biomarcadores, se propone que se puede medir haptoglobina mediante ELISA. Los niveles de haptoglobina en suero, juntamente con los ensayos de la función hepática (LFTs) determinados por los médicos, establecerán una puntuación más fiable para la fibrosis hepática.

30 Tabla 1. Sumario de proteínas seleccionadas expresadas diferencialmente identificadas en muestras de suero de controles sanos frente a las diferentes etapas de cicatrización hepática.^a

Clasificación	Nombre de la proteína	Cambios en relación con los controles			Función de la proteína
		Leve	Moderada	Cirrosis	
Asociada a plasmina	2M	↑	→	↑→	Inhibe plasmina
	ITIH4	-	-	↓←	Puede ser escindida por caliceína (conduce a activación del plasma)
Disminuida debido al compromiso en la función sintética hepática	Albúmina	-	-	↓	Proteína sintetizada en el hígado; proteína más abundante en el suero
	Prealbúmina (transtiretina)	-	-	↓	Proteína sintetizada en el hígado; porta vitamina A
	Complemento C3, C4 y proteína 1 relacionada con el factor H	←	↓	↓←	Proteína sintetizada en el hígado; implicada en la cascada del complemento
Relacionada con HGF	α1 antiqumiotripsina	-	-	↓	HGF disminuye α1 antiqumiotripsina
	Haptoglobina	↓	↓	↓←	HGF disminuye la síntesis de haptoglobina
Metabolismo de lípidos	Apo L1	-	-	←	Las concentraciones se correlacionan con triglicéridos y colesterol
	β2GP1	-	-	→	Se une a quilomicrones y HDLs
	Panoxonasa/arilesterasa 1	-	-	↓	Degrada lípidos oxidados en lipoproteínas y células
	Zinc-α2-glicoproteína	-	-	↓	Estimula la lipólisis en adipocitos
Relacionada con el sistema inmunitario	Semejante a antígeno CD5	-	-	→	Posible papel en la regulación del sistema inmunitario; relacionada con IgM
	Regiones de cadena pesada IgA1 + IgG2 y de cadena ligera de Ig	-	↑	↑←	Fragmentos de inmunoglobina

ES 2 457 243 T3

Clasificación	Nombre de la proteína	Cambios en relación con los controles			Función de la proteína
		Leve	Moderada	Cirrosis	
^a Las proteínas mostradas se expresaron diferencialmente en 2 veces o más cuando se comparan geles de suero procedentes de controles sanos con las diferentes etapas de fibrosis hepática.					
→, presente solamente en suero de pacientes con cicatrización hepática.					
↑, presente en suero de pacientes tanto de control como con cicatrización hepática, pero expresada en mayor grado en cicatrización hepática.					
-, sin cambio significativo.					
↓, presente en suero de pacientes tanto de control como con cicatrización hepática, pero expresada en mayor grado en suero de control.					
←, presente solamente en suero de controles sanos.					

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar una fibrosis, que comprende:
 - 5 a) determinar el nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
 - b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de apolipoproteína L1 (Apo L1) con el fin de determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis.
- 10 2. Procedimiento para evaluar la gravedad de la fibrosis, que comprende:
 - a) determinar el nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
 - 15 b) comparar dicho nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en la muestra biológica del paciente con un nivel predeterminado de apolipoproteína L1 (Apo L1) en una población de pacientes que comprende desde sin fibrosis a cirrosis.
3. Procedimiento para determinar el pronóstico de una fibrosis, que comprende:
 - 20 a) determinar el nivel de apolipoproteína L1 (Apo L1) en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
 - b) comparar dicho nivel con un nivel de control de apolipoproteína L1 (Apo L1) con el fin de determinar un pronóstico positivo o negativo de dicha fibrosis.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fibrosis incluye una regulación diferencial de apolipoproteína L1 (Apo L1).
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra biológica es suero.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicha fibrosis es fibrosis hepática.

FIG. 1

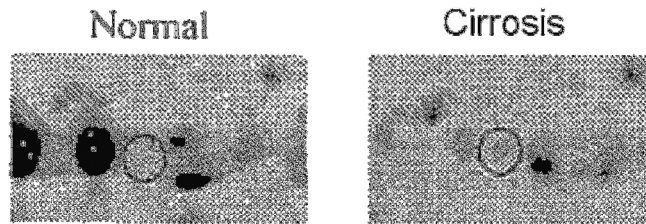


FIG. 2

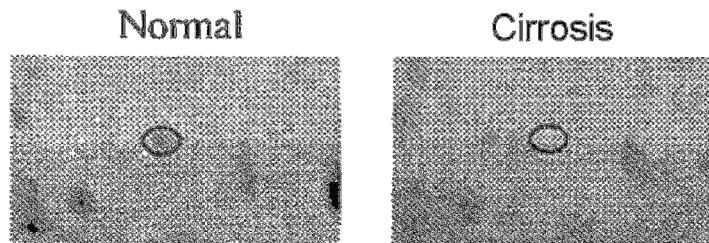


FIG. 3

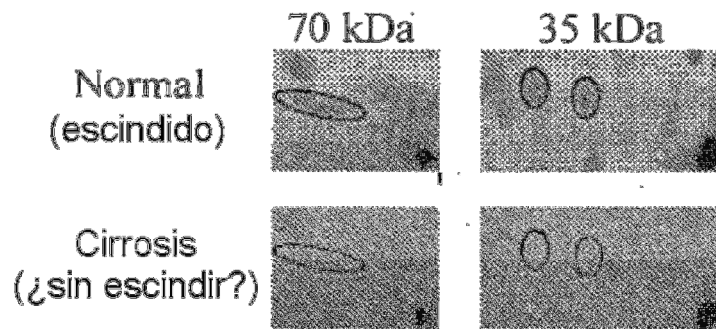


FIG. 4

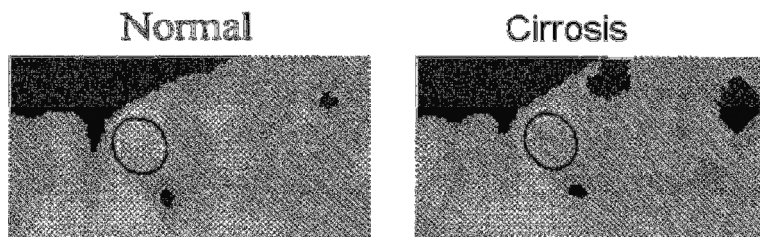


FIG. 5

