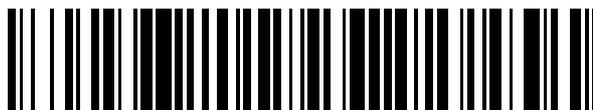


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 455**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2010 E 10725863 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2430451**

54 Título: **Diagnóstico clínico de fibrosis/cirrosis hepática usando biomarcadores de proteínas plasmáticas humanas poco abundantes**

30 Prioridad:

14.05.2009 US 178334 P

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

23.01.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 455 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 fibrosis / cirrosis hepática usando biomarcadores de proteínas plasmáticas humanas poco abundantes

5

Campo

La presente solicitud se refiere, en general, a procedimientos para diagnosticar fibrosis o cirrosis hepática usando un panel de anticuerpos dirigidos contra un panel novedoso de biomarcadores de cicatrización hepática muy poco abundantes. Estas proteínas novedosas también pueden servir como biomarcadores para hepatitis, carcinoma hepatocelular (CHC) así como dianas de fármaco para cicatrización hepática, hepatitis y CHC.

10

Antecedentes

15

Fibrosis hepática. La fibrosis hepática (fibrosis del hígado) es una respuesta a la cicatrización caracterizada por la acumulación excesiva de tejido cicatricial (es decir, matriz extracelular) en el hígado. Los elementos estructurales normales de los tejidos se reemplazan con cantidades excesivas de tejido cicatricial no funcional. La biopsia hepática por punción es la herramienta primaria para el diagnóstico y la evaluación de fibrosis pero existen una serie de limitaciones y desventajas bien documentadas para esta técnica, incluyendo el malestar del paciente, dolor, hemorragia y la muerte en raros casos. Además, una biopsia puede ser poco fiable si la fibrosis no es homogénea en todo el hígado. La fibrosis hepática puede estar provocada por diversos factores, incluyendo alcohol y virus.

20

25

Cirrosis. La cirrosis hepática es la forma más grave de cicatrización hepática, a diferencia de la fibrosis hepática, en general se considera que es irreversible y nodular. La cirrosis es la causa de más de 6.000 muertes cada año en el Reino Unido y aproximadamente 27.000 en los EE. UU., lo que la convierte 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 principal para CHC y, en esta fase de cáncer de hígado, en el único enfoque curativo es el trasplante de hígado. En el caso de cáncer de hígado inducido víricamente, la cicatrización hepática y el CHC puede volver a aparecer después del trasplante. Es imprescindible diagnosticar la fibrosis en las fases tempranas de cicatrización hepática reversible de forma que se pueda prevenir la cirrosis irreversible.

30

35

Virus de la hepatitis C. Aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo, es decir, un 3 % de la población mundial (véase, por ejemplo, WHO, J. Viral. Hepat, 1999; 6: 35-47), y aproximadamente 4 millones de personas en los Estados Unidos están infectados con el virus de la hepatitis C (VHC, HepC). El VHC es de las causas destacadas de fibrosis y cirrosis hepática. Aproximadamente un 80 % de los infectados de forma grave por el VHC se vuelven infectados de forma crónica. Por consiguiente, el VHC es una causa principal de hepatitis crónica. Una vez se está infectado de forma crónica, el virus casi nunca se elimina sin tratamiento. En casos raros, la infección por VHC provoca una enfermedad clínicamente aguda e incluso insuficiencia hepática. La infección por VHC crónica puede variar radicalmente entre individuos, en los que algunos tendrán una hepatopatía clínicamente insignificante o mínima y nunca desarrollarán complicaciones y otros tendrán una hepatitis crónica clínicamente aparente y podrán llegar a desarrollar fibrosis y cirrosis. Aproximadamente un 20 % de los individuos con VHC que desarrollan cirrosis desarrollarán enfermedad hepática en la fase final y tendrán un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de hígado primario.

40

45

Existe la necesidad de obtener procedimientos mejorados de diagnóstico de fibrosis hepática y cirrosis hepática en pacientes.

50

El documento US 2005/0136489 A1 y Devanshi Seth *et al.*: "Gene Expression Profiling of Alcoholic Liver Disease in the Baboon (*Papio hamadryas*) and Human Liver", The American Journal of Pathology, vol. 153, n.º 6, 1 de diciembre de 2003, páginas 2303-2317 se refiere a biomarcadores para hepatopatías y procedimientos para el uso de los mismos.

55

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Específicamente, la invención proporciona los siguientes puntos 1 a 4:

60

1. Un procedimiento de detección y evaluación de la gravedad de la fibrosis o cirrosis hepática, que comprende:

65

a) determinar el nivel de al menos un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y

b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis o cirrosis; en el que dicho al menos un polipéptido asociado a HF comprende proteína zeta/delta 14-3-3; y en el que la muestra biológica es suero o plasma.

5

2. Un procedimiento para la gradación de la gravedad de la fibrosis hepática, que comprende:

a) determinar el nivel de al menos un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y

10

b) comparar dicho nivel de polipéptidos asociados a HF en dicha muestra biológica del paciente con el nivel predeterminado de dichos polipéptidos asociados a HF en una población de pacientes que varía de sin fibrosis a cirrosis;

15

en el que dicho al menos un polipéptido asociado a HF comprende proteína zeta/delta 14-3-3; y en el que la muestra biológica es suero o plasma.

3. Un procedimiento de determinación del pronóstico de fibrosis hepática, que comprende:

a) determinar el nivel de un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y

20

b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis;

en el que dicho polipéptido asociado a HF es proteína zeta/delta 14-3-3; y

25

en el que la muestra biológica es suero o plasma.

4. Uso de un kit para realizar cualquiera de los procedimientos anteriores de la invención, en el que el kit comprende un agente asociado a HF que detecta específicamente el polipéptido asociado a HF proteína zeta/delta 14-3-3.

30

La descripción divulga también un procedimiento de detección de fibrosis y cirrosis, que comprende: (a) determinar el nivel de un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y (b) comparar dicho nivel (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis. Estos biomarcadores se pueden aplicar a cualquier enfermedad que presente fibrosis tal como fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis cutánea, fibrosis pancreática y similares, pero en modos de realización específicos la fibrosis es fibrosis hepática.

35

La presente descripción selecciona el polipéptido del grupo que consiste en: proteína zeta/delta 14-3-3, adiponectina, afamina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-HS-glicoproteína, apolipoproteína C-III, apolipoproteína E, cadena beta de la proteína de unión a C4b, complemento C3dg intacto/escindido, globulina de unión a corticoesteroide, cadena gamma de fibrinógeno, beta haptoglobina a pH 5,46 - 5,49, proteína relacionada con haptoglobina, hemopexina, cadena J de inmunoglobulina, alfa-2-glicoproteína rica en leucina, proteína inhibidora de transferencia lipídica, proteína de unión a retinol 4, paraoxonasa/ariesterasa sérica 1, globulina de unión a hormona sexual y cinc-alfa-2-glicoproteína. Estos biomarcadores se pueden usar junto con polipéptidos en el documento WO/2008/031051 incluyendo, fragmentos de cadena pesada de H4 inhibidora de inter- α -tripsina, α 1 antiqumotripsina, apolipoproteína L1, prealbúmina, albúmina, isoformas de proteína similar a antígeno de CD5, beta 2 glicoproteína I, α 2 macroglobulina y componentes de inmunoglobulina, α 1, cadenas α 2 y β de haptoglobina, componentes del complemento (C3, C4 y proteína relacionada con el factor H 1), adiponectina, ApoE, protrombina, clusterina y angiotensinógeno. En otros modos de realización, la fibrosis incluye la regulación de polipéptidos asociados a HF. En otros modos de realización, la muestra se toma de sangre, suero o plasma.

50

La descripción divulga un procedimiento para detectar un polipéptido asociado a HF que comprende: a) aislar una muestra biológica de un paciente con fibrosis o cirrosis, 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 los polipéptidos con expresión diferencial entre pacientes con y sin fibrosis o cirrosis. Cuando se usa 2D-PAGE, se pueden detectar biomarcadores usando intervalos de pH amplios usados comúnmente tales como pH 3-10, pH 3-11 o pH 4-7. Los biomarcadores muy poco abundantes se pueden detectar usando cualquier intervalo de pH estrecho entre pH 3-11, tal como pero sin limitarse a pH 3-5,6, pH 3-6, pH 3,9-5,1, pH 4,7-5,9, pH 5-8, pH 5,3-6,5, pH 5,5-6,7, pH 6-11, pH 6,2-7,5, pH 6,3-8,3, pH 7-10, pH 7-11, pH 3,5-4,5, pH 3-7 y pH 6-9. También se pueden usar geles 2D-PAGE que cubran estos intervalos de pH estrechos para identificar biomarcadores y dianas de fármaco novedosos en otras enfermedades.

60

La descripción divulga un procedimiento para la gradación de la gravedad de la fibrosis, que comprende: a) determinar el nivel de al menos un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y b) comparar dicho nivel de polipéptidos asociados a HF en dicha muestra biológica del paciente con el nivel predeterminado de dichos polipéptidos asociados a HF en una población de pacientes que varía de sin fibrosis a cirrosis.

65

La descripción divulga un kit útil para el pronóstico de fibrosis en individuos no tratados así como durante el transcurso del tratamiento, que comprende un agente asociado a HF en el que el agente detecta específicamente polipéptidos asociados a HF. En modos de realización específicos, el agente es un anticuerpo o equivalente funcional del mismo que se une a polipéptidos asociados a HF. Estos anticuerpos se pueden usar para realizar un inmunoensayo tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo, inmunotransferencia por puntos de proteína, transferencia Western, turbidimetría, nefelometría y similares. Los polipéptidos asociados a HF también se pudieron cuantificar usando enfoques sin anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, monitorización de reacción múltiple usando espectrometría de masas. El kit puede comprender además al menos una diana específicamente para detectar otro gen o producto génico útil como indicador de pronóstico.

La descripción divulga un procedimiento de determinación del pronóstico de fibrosis, que comprende: (a) determinar el nivel de un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y (b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 a 4. Estas figuras muestran los cambios observados en la expresión de los principales biomarcadores novedosos. Cada imagen muestra una región aumentada del gel de 2D-PAGE con la posición relativa de la proteína identificada marcada con un círculo. Se muestran imágenes de gel de plasma representativas para individuos sanos y para pacientes con cirrosis.

FIG. 1. Se muestra que la proteína inhibidora de la transferencia lipídica está presente en plasma normal pero está disminuida en plasma de pacientes cirróticos.

FIG. 2. Se muestra que la cinc-alfa-2-glicoproteína está presente en plasma normal pero está disminuida en plasma de pacientes cirróticos.

FIG. 3. Disminución en la casilla de beta haptoglobina a pH 5,46 - 5,49. PANEL SUPERIOR - Matriz uniformemente espaciada de puntos de beta haptoglobina que no muestran diferencia significativa entre plasma normal y plasma de pacientes cirróticos. PANEL INFERIOR - Imagen ampliada del punto de beta haptoglobina observado aproximadamente a pH 5,46 - 5,49 que muestra que está presente en plasma normal pero disminuido en plasma de pacientes cirróticos,

FIG. 4. Disminución en la escisión del complemento C3 en cirrosis. PANEL SUPERIOR - Se muestra que el complemento C3dg está ausente en plasma normal pero presente en plasma de pacientes cirróticos. PANEL INFERIOR - Se muestra que un fragmento de la cadena alfa del complemento C3 que precede a su sitio tioéster está presente en plasma normal pero ausente en plasma de pacientes cirróticos.

Descripción detallada de los modos de realización preferentes

La siguiente descripción explica la invención resumida anteriormente. Sin embargo, la invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos particulares descritos, y como tal puede variar. Asimismo, la terminología usada en el presente documento describe únicamente modos de realización particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la invención.

Los inventores han descubierto que varias proteínas se expresan diferencialmente en muestras de plasma humano de pacientes con cirrosis inducida por VHC cuando se comparan con individuos sanos. Este descubrimiento le logró comparando estas muestras de plasma usando una técnica que separa proteínas en dos dimensiones sobre una matriz de gel para dar puntos discretos de proteínas. Este enfoque usa geles con gradiente de pH inmovilizado de pH 3-5,6 de intervalo estrecho los que difiere de los geles con gradiente de pH inmovilizado de pH 3-10 usados en el documento WO/2008/031051.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica relevante.

a. Definiciones

Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de determinados términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

2D-PAGE" se refiere a electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional.

"ELISA" se refiere a ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

5

"CHC se refiere a carcinoma hepatocelular.

"VHC" se refiere a virus de hepatitis C

10

"HF" se refiere a fibrosis hepática

"kDa" se refiere a kilodalton.

15

"PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato.

"PBS-T" se refiere a solución PBS que contiene Tween.

20

En general, "muestra biológica" engloba una variedad de tipos de muestra obtenida de un organismo que se puede usar en un ensayo de diagnóstico o monitorización. El término engloba muestras de sangre y de otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como una pieza de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas del mismo y la progenie de las mismas. Adicionalmente, el término engloba células tumorales circulantes y otras células. El término engloba específicamente una muestra clínica e incluye además células en un cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, orina, líquido amniótico, líquidos biológicos y muestras de tejido. El término también engloba muestras que han sido manipuladas de algún modo después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento en determinados componentes. En los procedimientos reivindicados, la "muestra biológica" es suero o plasma.

25

30

"Secuencia biomolecular" o "secuencia" se refiere a toda o a una parte de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica.

35

"BLAST" se refiere a la herramienta básica de búsqueda de alineaciones locales (Basic Local Alignment Search Tool), una técnica para detectar subsecuencias sin huecos que coinciden con una secuencia de consulta dada. "BLASTP" es un programa BLAST que compara una secuencia aminoacídica de consulta con una base de datos de secuencias de proteínas. "BLASTX" es un programa BLAST que compara los productos de traducción conceptual en los seis marcos de una secuencia nucleotídica de consulta (ambas hebras) con una base de datos de secuencias de proteínas.

40

"Cáncer", "neoplasma" y "tumor", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a células o tejidos que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Los procedimientos y composiciones de la presente invención se aplican particularmente a células precancerosas (es decir, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas.

45

Una "fibrosis se caracteriza por la regulación diferencial de polipéptidos asociados a HF" se refiere a un sujeto con tejido que presenta cicatrización, y en el que una proteína asociada a HF tiene expresión diferencial.

50

"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 en general por anomalías en la formación de tejido cicatricial.

55

"Tipo celular" se refiere a una célula de una fuente dada (por ejemplo, tejido u órgano) o una célula en un estado de diferenciación dado, o una célula asociada con una patología o estructura genética dada.

60

"Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o emparejamiento conjuntamente de las superficies de interacción de una molécula de sonda y su diana. La diana y su sonda se pueden describir como complementarias, y además, las características de las superficies de contacto son complementarias entre sí.

El término "detectable" se refiere a un patrón de expresión polipeptídica que se puede observar usando técnicas descritas en esta solicitud y bien conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, la expresión polipeptídica se puede "detectar" por medio de técnicas estándar que incluyen inmunoensayos tales como transferencias Western.

65

"Diagnóstico" y "de diagnosticar" incluye en general una determinación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad o trastorno, una determinación de si un sujeto está afectado actualmente 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 Therametrics (por ejemplo, seguimiento de la afección de un sujeto para proporcionar información sobre el efecto o la eficacia del tratamiento).

5 "Expresión diferencial" se refiere a las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en los patrones temporales y de expresión tisular de un gen, por ejemplo, un gen expresado diferencialmente puede tener su expresión activada o completamente inactivada en condiciones normales frente a condiciones de enfermedad. Un gen regulado cualitativamente de este tipo puede presentar un patrón de expresión dentro de un tejido dado, tipo celular dado, o en el suero/plasma del sujeto que sea detectable en condiciones de control o bien de enfermedad, o detectable en ambas pero con expresión diferente. "Proteína expresada diferencialmente",
10 como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que identifica únicamente una proteína expresada diferencialmente de modo que la detección de la proteína expresada diferencialmente en una muestra se correlacione con la presencia de una proteína expresada diferencialmente en una muestra.

15 "Expresión", en general, se refiere al proceso por el que una secuencia polinucleotídica sufre una transcripción y traducción exitosas de modo que se expresen los niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o proteína. En determinados contextos en el presente documento, expresión se refiere a la producción de ARNm. En otro contexto, expresión se refiere a la producción de proteína o fragmentos de la misma. Los fragmentos se pueden producir por medio de escisión enzimática o procesos biológicos característicos de condiciones normales o de enfermedad.

20 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 se traduce o se modifica postraduccionalmente.

25 Un "fragmento de una proteína" se refiere a una parte de una proteína. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden comprender polipéptidos obtenidos por digestión de la proteína d+ aislada de células cultivadas. En un modo de realización, un fragmento de proteína comprende al menos aproximadamente 6 aminoácidos. En otro modo de realización, el fragmento comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos. Aún en otro modo de realización, el fragmento de proteína comprende al menos aproximadamente 16 aminoácidos.

30 En el contexto de la presente solicitud, el término "equivalente funcional" se refiere a una proteína que posee características funcionales o estructurales que son sustancialmente similares a toda o a parte de la proteína asociada a HF natural. El término "equivalente funcional" pretende incluir los "fragmentos", "mutantes", "derivados", "alelos", "híbridos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" de proteínas asociadas a HF naturales.
35

40 En el contexto de las inmunoglobulinas, el término "equivalente funcional" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que presentan propiedades de unión inmunológica que son sustancialmente similares a la inmunoglobulina original. "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 que la inmunoglobulina es específica. De hecho, un equivalente funcional de un anticuerpo monoclonal inmunoglobulina, por ejemplo, puede inhibir la unión del anticuerpo monoclonal original a su antígeno. Un equivalente funcional puede comprender fragmentos F(ab')₂, moléculas F(ab), fragmentos Fv, fragmento monocatenario variable presentado en fago (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos quiméricos, o similares, siempre que la inmunoglobulina presente las características de la inmunoglobulina original.
45

50 El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína compuesta de dos o más polipéptidos que, aunque no se unen típicamente en su estado natural, se unen por sus respectivos extremos amino y carboxilo terminales a través de un enlace peptídico para formar un único polipéptido continuo. Se entiende que los dos o más componentes polipeptídicos pueden unirse directamente o bien unirse indirectamente a través de un engarce/espaciador peptídico.

55 "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 se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante ininterrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos por los puntos de unión de ayuste apropiadas. Además, un gene puede contener una o más modificaciones en las regiones codificantes o bien las no traducidas que pueden afectar a la actividad biológica o a la estructura química del producto de expresión, la tasa de expresión, o la manera de control de la expresión. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones, inserciones, deleciones y sustituciones de uno o más nucleótidos.
60 A este respecto, dichos genes modificados se pueden denominar como "variantes" del gen "natural".

65 "Expresión génica" se refiere al proceso por el que una secuencia polinucleotídica sufre una transcripción y traducción exitosas de modo que se expresen los niveles detectables de la secuencia de nucleótidos.

El término "homología", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado de complementariedad.

- Puede existir homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente una secuencia idéntica de la hibridación a un polinucleótido diana; se hace referencia al uso del término 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 de solución y similares) bajo condiciones de baja restricción. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia o sonda completamente homóloga a la secuencia diana bajo condiciones de baja restricción. Esto no quiere decir que las condiciones de baja restricción sean 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 someter a prueba por el uso de una segunda secuencia diana que carezca incluso de un grado de complementariedad parcial (por ejemplo, una identidad de menos de aproximadamente un 30 %); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará a la segunda secuencia diana no complementaria.
- "Individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia. En un modo de realización preferente, el individuo, sujeto, huésped o paciente es un ser humano. Otros sujetos incluyen marmotas y patos en los que se sabe que desarrollan CHC y hepatitis. Otros sujetos pueden incluir, pero no se limitan a, ganado bovino, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, primates y ratones.
- "Aislado" se refiere a un polinucleótido, un polipéptido, una inmunoglobulina, o una célula huésped que está en un entorno diferente de aquel en el que se produce de forma natural el polinucleótido, el polipéptido, la inmunoglobulina o la célula huésped.
- "Etiqueta" se refiere a agentes que pueden proporcionar una señal detectable, directamente o bien a través de la interacción con uno o más miembros adicionales de un sistema productor de señales. Las etiquetas que son directamente detectables y que encuentran su uso en la invención incluyen etiquetas fluorescentes. Los fluoróforos específicos incluyen fluoresceína, rodamina, BODIPY, tintes de cianina y similares. La invención también contempla el uso de isótopos radioactivos, tales como ³⁵S, ³²P, ³H y similares, como etiquetas. También se pueden utilizar etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex). Véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 4366,241; 4.277.437; 4.275.149; 3.996.345; 3.939.350; 3.850.752; y 3.817.837.
- El término "condiciones fisiológicas normales" quiere decir condiciones que son típicas dentro de un organismo vivo o una célula. Aunque algunos órganos u organismos proporcionan condiciones extremas, normalmente el entorno intra-organismo e intracelular varía alrededor de pH 7 (es decir, de pH 6,5 a pH 7,5), contiene agua como disolvente predominante, y existe a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 50 °C. La concentración de diversas sales depende del órgano, organismo, célula o compartimento celular usado como referencia.
- "Polinucleótido" y "ácido nucleico", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos. Por tanto, estos términos incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN mono, bi o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbrido de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. Estos términos incluyen además, pero no se limitan a, ARNm o ADNc que comprenden secuencias intrónicas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se puede encontrar típicamente en ARN o ADN), o azúcar o grupos fosfato modificados o sustituidos. De forma alternativa, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y por tanto puede ser un oligodesoxinucleósido-fosforamidato o un oligómero de fosforamidato-fosfodiéster mezclado. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares, y grupos de unión tales como fluororibosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de etiqueta. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son caperuzas, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, e introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de etiqueta, otros polinucleótidos, o un soporte sólido. El término "polinucleótido" también engloba ácidos nucleicos peptídicos. Los polinucleótidos pueden comprender además ADN genómico, ADNc o híbridos ADN-ARN.
- "Polipéptido" y "proteína", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos traducidos, no traducidos, químicamente modificados, bioquímicamente modificados y derivatizados. Un polipéptido o proteína puede ser natural, recombinante o sintético, o cualquier combinación de estos. Además, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o péptido natural. Un polipéptido o proteína puede ser una molécula individual o un complejo multimolecular. Además, dichos polipéptidos o

proteínas pueden tener esqueletos peptídicos modificados. 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 residuos de metionina N-terminales, proteínas inmunológicamente marcadas, y similares.

5

"Predisposición" a una enfermedad o trastorno se refiere a la susceptibilidad de un individuo a dicha enfermedad o trastorno. Los individuos que son susceptibles tienen estadísticamente más probabilidad de tener cáncer o fibrosis, por ejemplo, en comparación con individuos normales/naturales.

10

Los términos "pronóstico" y "pronostica" se refieren al acto o técnica de predecir la evolución de una enfermedad. Adicionalmente, los términos se refieren a la probabilidad de supervivencia y recuperación de una enfermedad como se había previsto desde la evolución normal de esa enfermedad o como se había indicado por características especiales del caso individual. Además, los términos se refieren a la técnica o acto de identificar una enfermedad a partir de signos y síntomas.

15

Los términos "indicador de pronóstico" o "indicador" se refieren a cualquier cosa que pueda servir como, o que pueda referirse a, un fundamento o base para un pronóstico. Estos términos se refieren además a cualquier fundamento o base de un diagnóstico diferencial, incluyendo los resultados de pruebas y la caracterización de la expresión génica como se describe en el presente documento, 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 cualquier fundamento o base, incluyendo los resultados de pruebas y la caracterización de la expresión génica como se describe en el presente documento, que se pueden usar para distinguir la evolución probable de una enfermedad maligna.

20

25

"Agente de captación de proteínas" se refiere a una molécula o a un complejo multimolecular que puede unir una proteína a él mismo, en un modo de realización, los agentes de captación de proteínas se unen a sus compañeros de unión de una manera sustancialmente específica. En un modo de realización, los agentes de captación de proteínas pueden presentar una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 10^6 . El agente de captación de proteínas puede comprender una biomolécula tal como una proteína o un polinucleótido. La biomolécula puede comprender además una biomolécula natural, recombinante o sintética. Los ejemplos de agentes de captación de proteínas incluyen inmunoglobulinas, antígenos, receptores u otras proteínas, o porciones o fragmentos de las mismas. Además, se entiende que los agentes de captación de proteínas no se limitan a agentes que sólo interactúan con sus compañeros de unión a través de interacciones no covalentes. Más bien, los agentes de captación de proteínas también se pueden enlazar covalentemente a las proteínas con las que se unen. Por ejemplo, el agente de captación de proteínas se puede fotoreticular a su compañero de unión después de la unión.

30

35

40

"Identidad de secuencia" se refiere a un grado de similitud o complementariedad. Puede existir identidad parcial o identidad completa. Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente a una secuencia idéntica de la hibridación a un polinucleótido diana; hace referencia al uso del término funcional "sustancialmente idéntica". 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 de solución y similares) bajo 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 completamente idéntica a la secuencia diana bajo condiciones de baja restricción. Esto no quiere decir que las condiciones de baja restricción sean 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 someter a prueba por el uso de una segunda secuencia diana que carezca incluso de un grado de complementariedad parcial (por ejemplo, una identidad de menos de aproximadamente un 30 %); en ausencia de unión no específica, la sonda no hibridará a la segunda secuencia diana no complementaria.

45

50

55

Otra forma de ver la identidad de secuencia en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos incluye la referencia a residuos en las dos secuencias que sean los mismos cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una región específica. Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad de secuencia" quiere decir el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima 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 proporcionar 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 proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia.

60

65

"Condiciones restrictivas" se refiere a condiciones bajo las que se puede hibridar una sonda a su secuencia

polinucleotídica diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia (por ejemplo, secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas). En general, las condiciones restrictivas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de polinucleótido definidos) a la que un 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 salina sea una concentración de iones sodio al menos de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 M (u otras sales) a de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 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 retira de su entorno natural y está libre al menos aproximadamente en un 60 %, libre al menos aproximadamente en un 65 %, libre al menos aproximadamente en un 70 %, libre al menos aproximadamente en un 75 %, libre al menos aproximadamente en un 80 %, libre al menos aproximadamente en un 83 %, libre al menos aproximadamente en un 85 %, libre al menos aproximadamente en un 88 %, libre al menos aproximadamente en un 90 %, libre al menos aproximadamente en un 91 %, libre al menos aproximadamente en un 92 %, libre al menos aproximadamente en un 93 %, libre al menos aproximadamente en un 94 %, libre al menos aproximadamente en un 95 %, libre al menos aproximadamente en un 96 %, libre al menos aproximadamente en un 97 %, libre al menos aproximadamente en un 98 %, libre al menos aproximadamente en un 99 %, libre al menos aproximadamente en un 99,9 %, o libre al menos aproximadamente en un 99,99 % o más, 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 se une específicamente un agente de captación de proteínas. Es la presencia o la ausencia de la proteína diana lo que se va a detectar, o bien la cantidad de la proteína diana lo que se va a cuantificar. La proteína diana tiene una estructura que es reconocida por el agente de captación de proteínas correspondiente dirigido a la diana. El aminoácido o proteína diana también puede hacer referencia a la subestructura específica de una proteína más larga a la que se dirige el agente de captación de proteínas 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 la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcialmente de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad o síntoma se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

b. Polipéptidos asociados a HF

En un aspecto, la invención se refiere a "polipéptidos asociados a HF", lo que incluye polipéptidos con una expresión diferencial que está asociada con la fibrosis hepática y es al menos la proteína zeta/delta 14-3-3. Los polipéptidos asociados a HF también incluyen variantes de las proteínas naturales, en las que dichas variantes son idénticas o sustancialmente similares a la proteína natural. En general, los polipéptidos variantes tienen una secuencia que tiene una identidad de secuencia al menos aproximadamente de un 80 %, normalmente al menos aproximadamente de un 90 %, y más normalmente al menos aproximadamente de un 98 % con un polipéptido asociado a HF descrito en el presente documento, medido por BLAST. Los polipéptidos variantes pueden estar glucosilados de forma natural o de forma no natural.

En general, las variantes de los polipéptidos asociados a HF descritos en el presente documento tienen una identidad de secuencia mayor de al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 83 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,9 % o puede ser mayor de al menos aproximadamente un 99,99 % determinada por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como BLAST.

En un modo de realización, un polipéptido asociado a HF variante puede ser un polipéptido mutante. Las mutaciones en el polipéptido asociado a HF pueden resultar de, pero no se limitan a, sustituciones, adiciones

o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales. En general, las sustituciones de aminoácidos conservadoras son las que preservan la carga general, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o volumen estérico del aminoácido sustituido.

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

10 De forma importante, se pueden diseñar polipéptidos variantes para retener o tener potenciada la actividad biológica 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 consenso). La selección de alteraciones de aminoácidos para la producción de variantes se puede basar en la accesibilidad (interior frente a exterior) del aminoácido, la termoestabilidad del polipéptido variante, sitios de glucosilación deseados, puentes disulfuro deseados, sitios de unión a metal deseados, y sustituciones deseadas dentro de bucles de prolina. Las muteínas con eliminación de cisteína se pueden producir como se divulga en USPN 4.959.314.

15 Las variantes también incluyen fragmentos de los polipéptidos asociados a HF divulgados en el presente documento, en particular fragmentos biológicamente activos y fragmentos correspondientes a dominios funcionales. Típicamente, los fragmentos de interés serán de al menos aproximadamente 10 aa a al menos aproximadamente 15 aa de longitud, normalmente de al menos aproximadamente 50 aa de longitud, y pueden ser de hasta 300 aa de longitud o más largos. Las variantes de proteína descritas en el presente documento se codifican por los polinucleótidos que están dentro del alcance de la invención.

20 Los polipéptidos asociados a HF de la invención se proporcionan en un entorno no natural, por ejemplo, están separados de su entorno natural. En determinados modos de realización, la proteína asociada a HF está presente en forma sustancialmente purificada.

c. Agentes asociados a HF: Moduladores y compañeros de unión

30 En otro aspecto, la invención proporciona un "agente asociado a HF", que se refiere a una clase de moléculas que consiste en "compañeros de unión a polipéptido asociado a HF".

35 Los compañeros de unión a polipéptido asociado a HF son moléculas que se unen a polipéptidos asociados a HF. Compañeros de unión a polipéptidos ejemplares son inmunoglobulinas. Los compañeros de unión pueden modular, pero no necesariamente, la actividad biológica de un polipéptido asociado a HF.

d. Inmunoglobulinas

40 Los agentes asociados a HF usados para identificar proteínas asociadas a HF incluyen inmunoglobulinas y equivalentes funcionales de inmunoglobulinas que se unen específicamente a polipéptidos asociados a HF. Los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" se usan de manera intercambiable y en su sentido más amplio en el presente documento. Por tanto, engloban anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

45 En un modo de realización, las inmunoglobulinas objeto comprenden al menos un dominio constante humano. En otro modo de realización, los agentes asociados a HF inmunoglobulinas comprenden un dominio constante que presenta una identidad de secuencia al menos aproximadamente de un 90-95 % con un dominio constante humano y aún retiene la función efectora humana. Un agente asociado a HF inmunoglobulina o equivalente funcional del mismo puede ser humano, quimérico, humanizado, murino, injertado con CDR, presentado en fagos, presentado en bacterias, presentado en levaduras, producido por ratón transgénico, mutagenizado y aleatorizado.

i. Anticuerpos en general

55 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" cubren los anticuerpos totalmente ensamblados y fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), incluyendo anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpo. Preferentemente, las inmunoglobulinas o anticuerpos son quiméricos, humanos o humanizados.

60 Los dominios variables de la cadena pesada y ligera reconocen o se unen a un epítipo particular de un antígeno análogo. El término "epítipo" se usa para referirse a los sitios de unión específicos o determinante antigénico en un antígeno al que se une el extremo variable de la inmunoglobulina. Los epítipos pueden ser lineales, es decir, pueden estar compuestos de una secuencia de residuos aminoácidos que se encuentran en la secuencia asociada a HF primaria. Los epítipos también pueden ser conformacionales, de modo que una inmunoglobulina reconoce una estructura 3D que se encuentra en una molécula asociada a HF plegada. Los epítipos también pueden ser una combinación de elementos lineales y conformacionales. Además, las

porciones de carbohidratos de una molécula, expresadas por las células tumorales que llevan la diana, también pueden ser epítomos.

5 Se dice que las inmunoglobulinas están "unidas específicamente" si: 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión, y/o 2) no reaccionan de forma cruzada significativamente con moléculas polipeptídicas relacionadas conocidas. La afinidad de unión de una inmunoglobulina se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949). En algunos modos de realización, las inmunoglobulinas de la presente invención se unen a asociados a HF al menos 10^3 , más preferentemente al menos 10^4 , lo más preferentemente al menos 10^5 , y aún más preferentemente al menos 10^6 veces más que a otras proteínas.

ii. Anticuerpos policlonales y monoclonales

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

20 Los anticuerpos policlonales se incrementan preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc), intraperitoneales (ip) o intramusculares (im) del antígeno relevante y un coadyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar. Además, se usan de forma adecuada agentes de agregación tales como alumbre y otros para potenciar la respuesta inmunitaria.

25 El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

30 Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar mientras no se contaminen por otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir por el procedimiento de hibridoma o por procedimientos de ADN recombinante. Los agentes asociados a HF anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos.

35 iii. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Las inmunoglobulinas de unión a polipéptidos asociados a HF pueden ser "quiméricas" en el sentido de que una región variable puede provenir de una especie, tal como un roedor, y la región constante puede ser de una segunda especie, tal como un ser humano.

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

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

60 En la técnica se han descrito procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos en él de una fuente, que no es humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente sustituyendo secuencias de la región hipervariable con las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dicho anticuerpos humanizados son quimérico en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por

residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad.

- 5 En general, otros procedimientos implican conferir afinidad de unión a la CDR del donante en una estructura de región variable aceptora del anticuerpo. Un procedimiento implica simultáneamente injertar y optimizar la afinidad de unión de un fragmento de unión de la región variable. Otro procedimiento se refiere a la optimización de la afinidad de unión de una región variable del anticuerpo.

10 iv. Fragmentos de anticuerpo

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la unión a antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')²,
15 fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, 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
20 (CHI) de la cadena pesada.

El tratamiento de pepsina proporciona un fragmento F(ab')² que tiene dos sitios de unión a antígeno y aún puede reticularse al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CHI de cadena pesada incluyendo una o más
25 cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan 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.

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

40 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 enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Véase Pluckthun, 113, The Pharmacology of Monoclonal
45 Antibodies 269-315 (Rosenburg y Moore eds. 1994). Véanse también el documento WO 93/16185, las patentes de los EE. UU. N.º 5.587.458 y 5.571.894.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, ahora estos fragmentos se pueden producir directamente por células huésped recombinantes.

50 v. Conjugación y etiquetado

Los anticuerpos anti-proteínas asociadas a HF se pueden administrar en su forma "desnuda" o conjugada, o pueden tener otros agentes conjugados a ellos.

55 Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar en forma etiquetada de manera detectable. Los anticuerpos se pueden etiquetar de manera detectable a través del uso de radioisótopos, etiquetas de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), etiquetas enzimáticas (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) etiquetas fluorescentes (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Los procedimientos para llevar a cabo dicho etiquetado son bien conocidos en la técnica.

60 vi. Anticuerpos biespecíficos

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). Al usar un enlazador que es

demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno.

- 5 Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades.
- 10 En otro enfoque, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Específicamente, los dominios variables se fusionan con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH2, y CH3. En un modo de realización, la proteína de fusión comprende la primera región constante de cadena pesada (CH1) ya que
- 15 contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera. Los polinucleótidos que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se puede insertar en vectores de expresión separados y transfectarse conjuntamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en los modos de realización cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en
- 20 la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales dé como resultado rendimientos altos o cuando las proporciones no sean de particular importancia.
- 25 Los anticuerpos cremalleras de leucina y dímeros de Fv de cadena ligera (sFv).

e. Diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento de fibrosis

- 30 En otro aspecto, por tanto, la invención proporciona procedimientos para el uso de polipéptidos asociados a HF descritos en el presente documento para diagnosticar y pronosticar la fibrosis hepática como se define en las reivindicaciones. En modos de realización no limitantes específicos descritos en el presente documento, los procedimientos son útiles para detectar suero/plasma con polipéptidos asociados a HF, facilitar el diagnóstico de la fibrosis hepática y la gravedad de una fibrosis hepática en un sujeto, facilitar una
- 35 determinación del pronóstico de un sujeto, determinar la susceptibilidad a la fibrosis hepática en un sujeto, y evaluar el grado de respuesta del sujeto al tratamiento (por ejemplo, proporcionando una medida del efecto terapéutico, por ejemplo, a través de la evaluación de la masa tumoral durante o después de un régimen quimioterápico). Dichos procedimientos pueden implicar la detección de niveles de polipéptidos asociados a HF en una muestra biológica de suero/plasma de un paciente. Los procedimientos de detección descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo *in vitro*, en células aisladas, o en tejidos completos o un líquido
- 40 corporal, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina y similares. En un modo de realización, los polipéptidos asociados a HF se pueden usar para detectar y evaluar la fibrosis hepática.

f. Detectar un polipéptido asociado a HF

- 45 Se proporcionan procedimientos para detectar un polipéptido asociado a HF en suero o plasma. Para la detección se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoensayo, el uso de anticuerpo específico para el polipéptido codificado, por ejemplo, por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunotransferencia por puntos de proteínas, transferencia Western, turbidimetría, nefelometría y similares; y ensayos funcionales para
- 50 el polipéptido codificado, por ejemplo, actividad biológica. Los polipéptidos asociados a HF también se pudieron cuantificar usando enfoques sin anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, monitorización de reacción múltiple usando espectrometría de masas.

- 55 Como será evidente para el experto en la técnica tras la lectura de la presente memoria descriptiva, los procedimientos de detección y otros procedimientos descritos en el presente documento se pueden variar fácilmente. Dichas variaciones están dentro del alcance de la invención, por ejemplo, en el esquema de detección anterior, la sonda para su uso en la detección puede estar inmovilizada sobre un soporte sólido, y la muestra de prueba en contacto con la sonda inmovilizada. A continuación, se puede detectar la unión de la muestra de prueba a la sonda de varias formas, por ejemplo, detectando una etiqueta detectable unida a la
- 60 muestra de prueba para facilitar la detección de los complejos de sonda inmovilizada en muestra de prueba

- La descripción proporciona además procedimientos para detectar la presencia de y/o para medir un nivel de polipéptido asociado a HF en una muestra biológica, usando un anticuerpo específico para polipéptidos asociados a HF. Específicamente, el procedimiento para detectar la presencia de polipéptidos asociados a HF en una muestra biológica puede comprender la etapa de poner la muestra con un anticuerpo monoclonal y
- 65 detectar la unión del anticuerpo con el polipéptido asociado a HF en la muestra. Más específicamente, el

anticuerpo se puede etiquetar para producir una señal detectable usando compuestos incluyendo, pero sin limitarse a, un radiomarcador, una enzima, un cromóforo y un fluoróforo.

5 La detección de la unión específica de un anticuerpo específico para el polipéptido asociado a HF, o un
 10 equivalente funcional del mismo, cuando se compara con un control adecuado, es una indicación de que los
 polipéptidos asociados a HF están presentes en la muestra. Los controles adecuados incluyen una muestra
 conocida porque no contiene polipéptidos asociados a HF y una muestra puesta en contacto con un anticuerpo
 no específico para el polipéptido codificado, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotipo. En la técnica con
 15 conocidas una variedad de procedimientos para detectar interacciones anticuerpo-antígeno específicas y se
 pueden usar en el procedimiento, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos inmunohistológicos
 estándar, inmunoprecipitación, un inmunoensayo de enzimas, y un radioinmunoensayo. En general, el
 anticuerpo específico estará etiquetado de forma detectable, directa o bien indirectamente. Las etiquetas
 20 directas incluyen radioisótopos, enzimas con productos que son detectables (por ejemplo, luciferasa,
 3-galactosidasa, y similares); etiquetas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína isotiocianato, rodamina,
 ficoeritrina, y similares); metales emisores de fluorescencia (por ejemplo, ^{112}Eu , u otros de la serie de los
 lantánidos, unidos al anticuerpo a través de grupos quelantes metálicos tales como EDTA); compuestos
 quimioluminiscentes (por ejemplo, luminol, isoluminol, sales de acridinio y similares); compuestos
 25 bioluminescentes (por ejemplo, luciferina, eucorina (proteína verde fluorescente), y similares). El anticuerpo se
 puede unir (acoplar) a un soporte insoluble, tal como una placa o perla de poliestireno. Las etiquetas indirectas
 incluyen segundos anticuerpos específicos de anticuerpos específicos para el polipéptido codificado ("primer
 anticuerpo específico"); en las que el segundo anticuerpo está etiquetado como se describe anteriormente: y
 miembros de pares de unión específica, por ejemplo, biotina-avidina, y similares. La muestra biológica se
 30 puede poner en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte o vehículo sólido, tal como nitrocelulosa, que
 pueda inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. A continuación, se puede lavar el soporte
 con tampones adecuados, seguido de poner en contacto con un primer anticuerpo específico etiquetado de
 forma detectable. Los procedimientos de detección son conocidos en la técnica y se elegirán según sea
 apropiado para la señal emitida por la etiqueta detectable. En general, la detección se logra en comparación
 con controles adecuados y con estándares apropiados.

30 g. Kits

Los procedimientos de detección se pueden proporcionar como parte de un kit. Por lo tanto, la invención
 proporciona además el uso de kits como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos que usan estos
 35 kits se pueden llevar a cabo por laboratorios clínicos, laboratorios experimentales, médicos de cabecera o
 individuos privados. Los kits de la descripción para detectar un polipéptido asociado a HF que se expresa
 diferencialmente durante la fibrosis. El kit puede proporcionar componentes adicionales que sean útiles en los
 procedimientos, incluyendo, pero sin limitarse a, tampones, reactivos de desarrollo, etiquetas, superficies
 reaccionantes, medios para la detección, muestras de control, estándares, instrucciones e información
 40 interpretativa.

40

Ejemplos

Proteínas expresadas diferencialmente establecidas al comparar el plasma de individuos sanos normales con
 45 pacientes con cirrosis

45

Los inventores han descubierto que varias proteínas se expresan diferencialmente en muestras de plasma
 humano de pacientes con cirrosis inducida por VHC cuando se comparan con individuos sanos. Este
 descubrimiento le logró comparando estas muestras de plasma usando electroforesis en gel de poliacrilamida
 50 bidimensional (2D-PAGE), una técnica que separa proteínas en dos dimensiones sobre una matriz de gel para
 dar puntos discretos de proteínas. La 2D-PAGE usando un intervalo de pH 3-10 amplio se usó previamente en
 el documento WO/2008/031051 para identificar biomarcadores en suero para fibrosis hepática. La
 identificación de los biomarcadores de fibrosis en la invención en el presente documento difiere del documento
 WO/2008/031051 puesto que se usó un intervalo de 3-5,6 estrecho. Se eligió este intervalo de pH puesto que
 55 está fuera del intervalo de las principales isoformas de las tres proteínas de plasma/suero más abundantes;
 albúmina, IgG y transferrina. Esta es la primera vez que se ha usado este intervalo de pH 3-5,6 para el
 descubrimiento de biomarcadores.

El descubrimiento de biomarcadores novedosos en enfermedades se ve obstaculizado por el intervalo de
 60 concentración de proteínas dinámicas en suero y en plasma que abarca más de diez órdenes de magnitud. En
 consecuencia, las proteínas altamente abundantes, en especial albúmina, inmunoglobulinas y transferrina,
 limitan la detección de proteínas menos abundantes. Para superar este problema en la búsqueda de
 biomarcadores muchos han intentado estrategias de fraccionamiento previo basadas en la afinidad por tinte y
 anticuerpo para eliminar proteína altamente abundantes de las muestras antes de la electroforesis para
 mejorar la representación de las proteínas menos abundantes. Sin embargo, la inmunoprecipitación es
 65 costosa debido a la gran cantidad de anticuerpo requerido para eliminar estas proteínas altamente abundantes
 y los procedimientos de afinidad por tinte son menos eficaces y menos específicos con la retirada no deseada

de un gran número de proteínas distintas a albúmina y, por tanto, pueden retirar biomarcadores potenciales en el análisis de proteinoma. A diferencia de la gran cantidad de proteína usada en la presente invención (2 mg), es muy difícil cargar niveles altos similares de proteína después de la eliminación para múltiples muestras debido a los problemas de recuperación durante la retirada de proteínas altamente abundantes así como pérdidas durante la concentración.

A pesar del problema de las proteínas altamente abundantes en plasma, se ha usado 2D-PAGE sobre un intervalo de pH 3-10 amplio para identificar exitosamente varios biomarcadores candidatos novedosos para la fibrosis hepática en el documento WO/2008/031051. En la presente invención, este panel de biomarcadores para la fibrosis hepática se incrementa con el uso de 2D-PAGE con una extensión de pH 3-5,6 estrecha fuera del intervalo para las principales isoformas de albúmina, inmunoglobulinas y transferrina, lo que permite que se cargue cuatro veces más proteína que en el documento WO/2008/031051. Esto permitió la potenciación de la representación de casillas menos abundantes así como una mejora en la separación. La separación a base de gel significativamente mejorada del proteinoma ácido tanto para suero como para plasma se logró usando este intervalo de pH y se permitió la identificación de biomarcadores menos abundantes para la fibrosis hepática que no eran visibles en el documento WO/2008/031051 usando el intervalo de pH 3-10 amplio.

Ejemplo 1

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

Para identificar biomarcadores para cicatrización hepática inducida por, se analizaron muestras de plasma de individuos sanos y pacientes con cirrosis inducida por VHC (6 individuos en cada grupo) en un estudio proteómico basado en 2D-PAGE. Se recogieron todas las muestras de plasma en tubos P100 (BD, Oxford, Reino Unido). Se eligieron estos tubos de plasma P100 puesto que, a diferencia de cualquier otro tubo de extracción sanguínea, contienen estabilizantes de proteínas farmacéuticas que se solubilizan inmediatamente a medida que se extrae la sangre, lo que potencia la recuperación y la preservación de las proteínas, haciendo que sean ideales para el análisis de proteinoma y el descubrimiento de biomarcadores. A diferencia del documento WO/2008/031051 en el que se analizaron sueros de pacientes con varios grados de fibrosis hepática, la presente invención sólo se centra en proteínas expresadas diferencialmente entre muestras de individuos sanos y pacientes cirróticos. Se adoptó este enfoque puesto que dotas las proteínas expresadas diferencialmente identificadas previamente en fibrosis leve a moderada también se habían observado en la cirrosis, lo que sugiere que el análisis de estas etapas intermedias de fibrosis en este estudio no daría lugar a ningún otro biomarcador de fibrosis candidato. Se separaron 2 miligramos de proteínas de plasma por carga usando un gradiente no lineal de pH 3-5,6 en la primera dimensión del gel seguido del peso molecular (tamaño) en la segunda dimensión usando un gradiente de SDS-PAGE del 9-16 % (p/v). Se realizaron electroforesis, tinción fluorescente y barrido de geles, tal como se describe por Gangadharan *et al.*, (2007), Clin. Chem., 53, 1792.

Ejemplo 2

Análisis de imagen diferencial e identificación de proteínas

Se comparó la matriz bidimensional de puntos generados entre muestras de plasma normal y con cirrosis por análisis de imagen asistido por ordenador.

Se analizaron las imágenes escaneadas de geles de 2D-PAGE por análisis de imagen asistido por ordenador, como se describe por Gangadharan *et al.*, (2007), Clin. Chem., 53,1792. Los cambios expresados diferencialmente que eran mayores que o iguales a una diferencia de 2 veces se consideraron significativos. Un total de 57 casillas expresadas diferencialmente se excitaron, se digirieron con tripsina, y se analizaron por espectrometría de masas, como se describe por Gangadharan *et al.*, (2007), Clin. Chem., 53, 1792.

Ejemplo 3

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

El análisis de imagen diferencial reveló pruebas iniciales de biomarcadores en plasma potenciales. Véanse las figuras 1-4. Este análisis mostró que la expresión de la proteína inhibidora de la transferencia lipídica, cinc-alfa-2-glucoproteína, beta haptoglobina a pH 5,46-5,49, proteína relacionada con haptoglobina, apolipoproteína C-III, apolipoproteína E, cadena beta de proteína de unión a C4b, paraoxonasa/ariesterasa 1, proteína de unión a retinol 4, afamina, alfa-2-HS-glucoproteína, globulina de unión a corticoesteroide, alfa-2-glucoproteína rica en leucina y cadena gamma de fibrinógeno, disminuyó en suero cirrótico, mientras que la expresión del complemento C3dg intacto, cadena J de inmunoglobulina, globulina de unión a hormona sexual, proteína zeta/delta 14-3-3, adiponectina y alfa-1-antitripsina se incrementó. También se observó la modificación postraduccional de la glucoproteína hemopexina.

También se identificaron biomarcadores de fibrosis ya mencionados en el documento WO/2008/031051: incremento en la proteína similar a antígeno CD5 y cadenas alfa/kappa de Ig, disminución en alfa-1-antiquimotripsina, clusterina, complemento C4, cadena pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina H4 y transtirretina. En el caso de la cadena pesada del inhibidor de inter-alfa-tripsina H4, el análisis de secuencias peptídicas por espectroscopía de masas confirmó que la forma no escindida de esta proteína disminuía, cuando previamente en el documento WO/2008/031051 sólo se identificó que disminuían los fragmentos escindidos de 35 y 70 kDa.

Todas las proteínas mencionadas anteriormente se identificaron como proteína de puntuación superior por el análisis de espectrometría de masas. Otras proteínas de menor puntuación se identificaron en las casillas de gel y tenían menos probabilidad de ser responsables de los cambios expresados diferencialmente, aunque esto no se pudo excluir. Las proteínas con menor puntuación identificadas tenían un incremento en cadenas lambda de Ig y apolipoproteína AI y una disminución en albúmina, AMBP, protrombina, factor derivado del epitelio pigmentario y componente amiloide-P del suero.

Pacientes con cirrosis	
Disminución	Incremento
proteína inhibidora de la transferencia lipídica	complemento C3dg intacto
cinc-alfa-2-glicoproteína	cadena J de inmunoglobulina
beta haptoglobina a pH 5,46 - 5,49	globulina de unión a hormona sexual
proteína relacionada con haptoglobina	proteína zeta/delta 14-3-3
apolipoproteína C-III	adiponectina
apolipoproteína E	alfa-1-antitripsina
cadena beta de proteína de unión a C4b	
paraoxonasa/arilesterasa 1	
proteína de unión a retinol 4	
afamina	
alfa-2-HS-glicoproteína	
globulina de unión a corticoesteroide	
alfa-2-glicoproteína rica en leucina	
cadena gamma de fibrinógeno	

Ejemplo 4

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

Se descubrió que un fragmento del complemento C3 se incrementaba en la cirrosis y se observó en el gel de 2D-PAGE a 39 kDa con un punto isoeléctrico aproximado de pl 4,9. Los aminoácidos identificados por espectroscopía de masas para este fragmento abarcaron de 955 a 1201. Los aminoácidos para el complemento C3dg abarcan de 955 a 1303 y su peso molecular y punto isoeléctrico (39 kDa y pl 5) teóricos están en línea con la característica de gel observada, lo que confirma que el fragmento del complemento C3 en la característica es complemento C3dg. Se sabe que el complemento C3dg tiene un sitio tioéster en los aminoácidos 1010 a 1013 que se puede escindir por plasmina, una enzima implicada en la fibrólisis. Se sabe que la plasmina disminuye en la fibrosis y esto es consistente con el incremento en los niveles de complemento C3dg no escindido observado en la cirrosis. En el documento WO/2008/031051, se descubrió que un fragmento del complemento C3 disminuía en fibrosis y cirrosis, que se observó a 49 kDa pl 6,9 y se demostró que los aminoácidos identificados por espectrometría de masas eran la cadena alfa del complemento C3 que precede el sitio tioéster lo que confirma la disminución de la escisión mediada por plasmina del complemento C3 en la fibrosis (Gangadharan *et al*, (2007), Clin. Chem.,53, 1792). Por lo tanto, en la presente invención, un anticuerpo dirigido contra el sitio de escisión de plasmina del complemento C3 (es decir, que solapa el sitio tioéster en los aminoácidos 1010 a 1013) ayudaría a determinar la extensión de la escisión. En la actualidad, parece que no existen anticuerpos comercialmente disponibles contra la región del sitio tioéster del complemento C3. Un anticuerpo contra la región de escisión puede ayudar de forma más fiable a determinar el incremento en los niveles del complemento C3 no escindido en la cicatrización hepática.

Se sabe que la haptoglobina total disminuye en la fibrosis y se usa actualmente junto con otras proteínas para diagnosticar la fibrosis hepática (véase el documento WO0216949). En la presente invención, se descubrió que una beta haptoglobina que contenía una característica de 2D-PAGE a pH 5,46 - 5,49 disminuía en la

5 cirrosis y parecía más fiable que la haptoglobina total. Se sabe que la haptoglobina tiene cuatro sitios de glucosilación potenciales, de los que todos están en su cadena beta. Normalmente la beta haptoglobina está glucosilada en plasma / suero. Cuando se separa plasma / suero por 2D-PAGE, la beta haptoglobina se observa como una matriz de casillas uniformemente espaciada entre pH 4,7 y 5,8, lo que puede mostrar una disminución en la cicatrización hepática. En la presente invención, la casilla de gel de 2D-PAGE de haptoglobina a pH 5,46 - 5,49 se disminuyó en cirrosis y parecía que era más fiable que otras casillas de beta haptoglobina entre pH 4,7 y 5,8.

10 Ejemplo 5

15 Se puede formular una escala de puntuación de fibrosis para cada uno de los biomarcadores novedosos. Se determina la concentración promedio de estos biomarcadores en suero sobre las diversas fases de la fibrosis hepática. Actualmente se usa una escala de 0 a 6 para evaluar la fibrosis hepática en la clínica, donde 0 representa nada de fibrosis, 1-5 representan las fases intermedias de fibrosis incrementando la gravedad de leve a moderada/grave y 6 es cirrosis (Ishak, (1995), J Hepatol, 22, 696). Al determinar los intervalos de concentración de los biomarcadores novedosos a lo largo de estas siete fases, se puede asignar un sistema de puntuación similar de 0 a 6. Los resultados aditivos de las puntuaciones de todos los biomarcadores novedosos dan una indicación más fiable del grado de fibrosis en lugar de examinar los biomarcadores individuales.

20 Ejemplo 6

Inmunoensayo

25 La descripción proporciona un kit para la evaluación de la fibrosis que detecta los polipéptidos asociados a HF. Esto se logra usando anticuerpos que se unen a los polipéptidos asociados a HF. Estos anticuerpos se pueden usar para realizar un inmunoensayo tal como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELIS A), radioinmunoensayo, inmunotransferencia por puntos de proteínas, transferencia Western, turbidimetría, nefelometría y similares. Los polipéptidos asociados a HF también se pudieron cuantificar usando enfoques sin anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, monitorización de reacción múltiple usando espectrometría de masas.

35 En los casos de un ELISA, el ensayo se puede realizar en una placa de 96 pocillos. Una opción es la de usar el ELISA de un sitio de unión no competitivo. En este ensayo, se preparan concentraciones conocidas de antígeno (en este ejemplo, los biomarcadores novedosos y muestras de suero) en un tampón bicarbonato, se añaden a la placa de 96 pocillos y se incuba durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavan tres veces los pocillos con una solución de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween (PBS-T) seguido de bloqueo con una solución de PBS que contiene seroalbúmina bovina. Después de incubar a 37 °C durante 1 hora, se añade un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno (en este ejemplo, el biomarcador de interés), se incuba la placa a 37 °C durante 1 hora y a continuación se lava tres veces con PBS-T. A continuación se añade un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante, dirigido contra el animal origen del anticuerpo primario, y se incuba la placa a 37 °C durante 1 hora seguido de tres lavados con PBS-T. Finalmente, se añade un sustrato de peroxidasa tal como ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) a cada pocillo y se lee la absorbancia en un lector de placas a 405 nm después de 30 minutos.

45 De forma alternativa, se puede usar un ELISA de tipo sándwich. En este tipo de ensayo, se une un anticuerpo a la parte inferior de un pocillo de la placa. Se añade el antígeno, en este caso la proteína biomarcadora, y se retiran los productos no unidos por lavado. A continuación, se añade un segundo anticuerpo etiquetado que se une al antígeno. Se cuantifica la cantidad de anticuerpo secundario unido, normalmente de forma colorimétrica. Además de los biomarcadores novedosos, los inventores proponen que se puede medir la haptoglobina por ELISA. Los niveles de haptoglobina en suero, conjuntamente con las pruebas de la función hepática determinadas por los médicos, establecerán una puntuación más fiable para la fibrosis del hígado.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un procedimiento de detección y evaluación de la gravedad de la fibrosis o cirrosis hepática, que comprende:
- a) determinar el nivel de al menos un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
- 10 b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis o cirrosis; en el que dicho al menos un polipéptido asociado a HF comprende proteína zeta/delta 14-3-3; y en el que la muestra biológica es suero o plasma.
- 15 2. Un procedimiento para la gradación de la gravedad de la fibrosis hepática, que comprende:
- a) determinar el nivel de al menos un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
- 20 b) comparar dicho nivel de polipéptidos asociados a HF en dicha muestra biológica del paciente con el nivel predeterminado de dichos polipéptidos asociados a HF en una población de pacientes que varía de sin fibrosis a cirrosis; en el que dicho al menos un polipéptido asociado a HF comprende proteína zeta/delta 14-3-3; y en el que la muestra biológica es suero o plasma.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la fibrosis incluye la regulación diferencial de polipéptidos asociados a HF.
4. Un procedimiento de determinación del pronóstico de fibrosis hepática, que comprende:
- 30 a) determinar el nivel de un polipéptido asociado a HF en una muestra biológica obtenida de un paciente; y
- b) comparar dicho nivel de (a) con un nivel de control de dicho polipéptido asociado a HF para determinar un diagnóstico positivo o negativo de dicha fibrosis;
- 35 en el que dicho polipéptido asociado a HF es proteína zeta/delta 14-3-3; y en el que la muestra biológica es suero o plasma.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la fibrosis se caracteriza por la regulación diferencial de polipéptidos asociados a HF.
- 40 6. Uso de un kit para realizar el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el kit comprende un agente asociado a HF que detecta específicamente el polipéptido asociado a HF proteína zeta/delta 14-3-3.
- 45 7. El uso de la reivindicación 6, en el que dicho agente es un anticuerpo o equivalente funcional del mismo que se une a la proteína zeta/delta 14-3-3.

FIG. 1

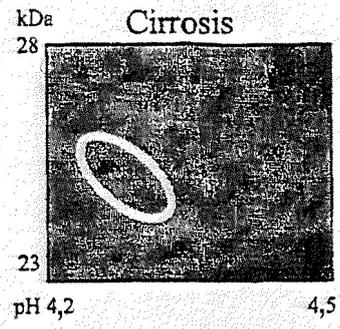
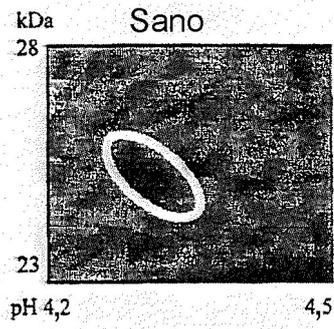


FIG. 2

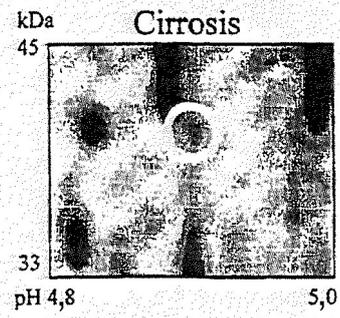
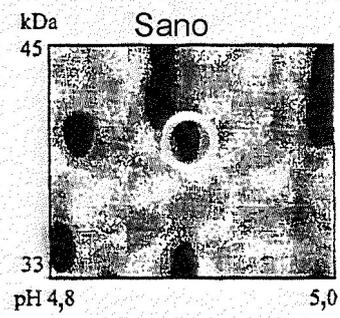


FIG. 3

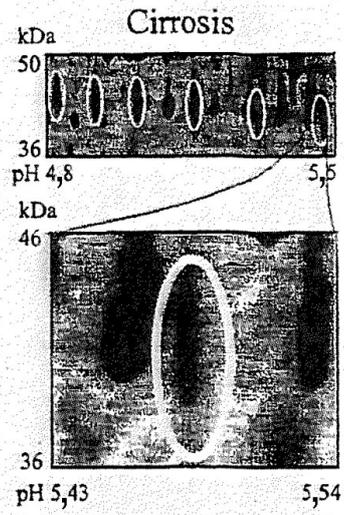
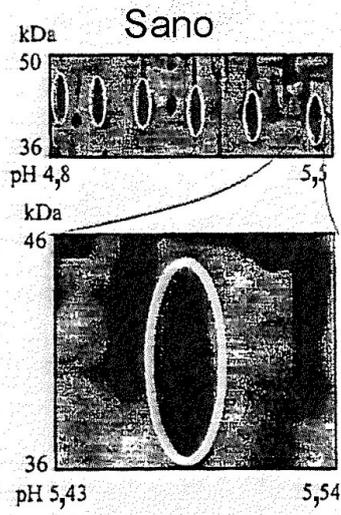


FIG. 4

