

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 101**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10715752 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2414844**

54 Título: **Ensayo de biomarcadores para fibrosis**

30 Prioridad:

30.03.2009 US 211467 P
22.12.2009 US 289081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2015

73 Titular/es:

NORDIC BIOSCIENCE A/S (50.0%)
Herlev Hovedgade 207
2730 Herlev, DK y
NOVARTIS AG (50.0%)

72 Inventor/es:

VEIDAL, SANNE S.;
KARSDAL, MORTEN A.;
LEEMING, DIANA J.;
BARASCUK, NATASHA;
SKJOT-ARKIL, HELENE;
SEGOVIA-SILVESTRE, ANTONIO y
VASSILIADIS, EFSTATHIOS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

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

ES 2 529 101 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

Ensayo de biomarcadores para fibrosis

5 La presente invención se refiere a ensayos de biomarcadores útiles en el diagnóstico de la enfermedad de la fibrosis y en el pronóstico de su desarrollo, incluyendo biomarcadores que indican el riesgo de desarrollar fibrosis después de una lesión crónica.

10 Las enfermedades fibróticas (incluidas las que se enumeran en la Tabla 1) son la principal causa de morbilidad y mortalidad, por ejemplo, la cirrosis con 800,000 muertes por año en el mundo¹.

Tabla 1. Diferentes enfermedades fibróticas²

Tejido	Ejemplos de Causas
15 Hígado	Hepatitis virales
	Esquistosomiasis
	Esteatohepatitis (alcohólica o no alcohólica)
20 Pulmón	Fibrosis pulmonar idiopática (IPF)
	Esclerosis sistémica (Esclerodermia)
25 Riñón	Fibrosis sistémica nefrogénica (NSF)
	Diabetes
	Hipertensión no tratada
30 Corazón	Infarto
	Hipertensión
	Ateroesclerosis
	Restenosis
35 Ojos	Degeneración macular, retinopatía vítrea y retinal
Piel	Esclerosis sistémica y esclerodermia, queloides, cicatrices hipertróficas, quemaduras, factores genéticos NFS
Páncreas	Causas autoinmunes/hereditarias
40 Intestino	Enfermedad de Crohn/enfermedad intestinal inflamatoria
Cerebro	Enfermedad de Alzheimer, SIDA
Médula ósea	Cáncer, envejecimiento
45 Fibrosis multiorgánica	Complicaciones quirúrgicas, fibrosis que se induce por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis que se induce por radiación, lesiones mecánicas

50 Una "enfermedad fibrótica" es cualquier enfermedad que da lugar a la fibrosis, ya sea como síntoma principal o secundario.

La fibrosis es el resultado final de las reacciones inflamatorias crónicas que se inducen por una variedad de estímulos que incluyen las infecciones persistentes, las reacciones autoinmunes, las respuestas alérgicas, los daños químicos, la radiación y la lesión tisular. La fibrosis se caracteriza por la acumulación y la reorganización de la matriz extracelular (ECM). A pesar de tener distinciones etiológicas y clínicas evidentes, la mayoría de los trastornos fibróticos crónicos tienen en común una irritación persistente que sustenta la producción de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogénicas, que en conjunto estimulan la deposición de elementos del tejido conectivo, especialmente de colágenos y proteoglicanos, que remodelan progresivamente y destruyen la arquitectura normal del tejido^{3,4}. A pesar de su

enorme impacto en la salud humana, actualmente no existen tratamientos aprobados que se destinen directamente a los mecanismos de la fibrosis ⁵.

5 El mediador celular clave de la fibrosis es el miofibroblasto, que al activarse sirve como célula primaria productora de colágeno.

Matriz Extracelular (ECM)

10 La fibrogénesis es un proceso dinámico que implica mecanismos celulares y moleculares complejos que generalmente se originan en la lesión tisular ⁶. La fibrogénesis es el resultado de un desequilibrio en la regulación normal de la ECM que altera la concentración de las macromoléculas lo que conduce a un aumento del tamaño y de la densidad del tejido, con deterioro progresivo de su función. Estas macromoléculas son principalmente proteínas fibrosas con funciones adhesivas y estructurales, tales como colágenos y proteoglicanos.

15 Colágeno

Los colágenos se distribuyen de manera amplia en el cuerpo humano, es decir ~ 30 % de la masa de proteínas en el cuerpo humano se compone de colágenos. Los colágenos son responsables de la integridad estructural de la ECM de la mayoría de los tejidos conectivos. El contenido de la ECM resulta de un fino equilibrio entre la síntesis y la degradación que se controla estrechamente mediante la regulación de la expresión génica y la secreción de proteínas, pero también a través de la inhibición endógena de las proteasas y la degradación de las proteínas por las metaloproteinasas y las proteasas de cisteína ⁷⁻⁹. En la Tabla 2 se enumeran los principales tipos de colágeno con su principal distribución tisular.

Tabla 2. Principales tipos de colágeno y su distribución en los tejidos.

25

Tipo de colágeno	Distribución tisular
I	Mayoría de los tejidos conectivos
II	Cartílago, humor vítreo
III	Tejidos conectivos extensibles, por ejemplo, hígado, piel, pulmón, sistema vascular
IV	Membranas basales
V	Tejidos que contienen colágeno I
VI	Mayoría de los tejidos conectivos
VII	Piel, vejiga, mucosa oral, cordón umbilical, amnios
VIII	Muchos tejidos, especialmente el endotelio
XIII	Células endoteliales, piel, ojos, corazón, músculo esquelético
XIV	Vasos, hueso, piel, cartílago, ojos, nervios, tendones, útero
XXI	Vasos, corazón, estómago, riñones, músculo esquelético, placenta

45

El colágeno tipo I es el colágeno más abundante y se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos. Es especialmente importante para la estructura de los huesos y de la piel donde los principales componentes de colágeno son los colágenos de tipo I y III ¹⁰.

50

Los colágenos tipo I y III son los principales componentes del hígado y del pulmón en una relación 1:1 en los tejidos sanos. Adicionalmente, los colágenos tipo IV y VI se encuentran en las membranas basales en la mayoría de los tejidos. La localización más frecuente del colágeno de tipo V es dentro de las fibrillas de colágeno características, en asociación con los colágenos de tipo I y III ¹⁰.

55

Algunos colágenos tienen una distribución tisular restringida: por ejemplo, el de tipo II, que se encuentra casi exclusivamente en el cartílago ¹¹.

Durante la fibrogénesis la cantidad neta de colágeno aumenta¹²⁻¹⁴. La Tabla 3 muestra, en forma de ejemplo, el aumento de colágeno durante la fibrosis hepática.

5 Tabla 3. Cambios de la composición de colágeno entre el hígado humano normal y el cirrótico¹⁵.

Tipo de colágeno	Cadenas	Colágeno del hígado normal (mg/g)	Colágeno del hígado cirrótico (mg/g)	Veces que aumentó	Distribución en el hígado normal (%)	Distribución en el hígado cirrótico (%)
I	α_1 (I)		16	8	37	42
	α_2 (I)	2				
III	α_1 (III)	2	8	4	37	21
IV	α_1 (IV)	0.5	7	14	9	18
	α_2 (IV)					
V	α_1 (V)	0.9	7	8	17	18
	α_2 (V)					
	α_3 (V)					
VI	α_1 (VI)	0.01	0.1	10	0.2	0.3
	α_2 (VI)					

30 Elastina

La elastina es una proteína presente en muchos tejidos conectivos, fundamentalmente en los que son elásticos. Tiene un muy alto contenido de los aminoácidos glicina, valina, alanina y prolina, y tiene un peso molecular de 64 a 66 kDa. Se organiza en una conformación helicoidal irregular o al azar compuesta por 830 aminoácidos. La elastina se elabora mediante el enlace de muchas moléculas solubles de la proteína tropoelastina, en una reacción que se cataliza por la lisil oxidasa, para elaborar una matriz reticulada durable, insoluble masiva.

La elastina cumple una importante función en las arterias como un medio para la propagación de la onda de presión para ayudar al flujo sanguíneo y es particularmente abundante en los grandes vasos sanguíneos elásticos tales como la aorta. La elastina es también muy importante en los pulmones, los ligamentos elásticos y la piel.

A pesar de muchos esfuerzos que se dedican a la comprensión de la síntesis y de la facturación de la elastina, los neo-epítomos procedentes del clivaje proteolítico de estas moléculas de la matriz no se asocian hasta ahora con el desarrollo de la enfermedad en la fibrosis.

45 Vimentina

La vimentina es un miembro de la familia de proteínas de filamentos intermedios. Los filamentos intermedios son una importante característica estructural de las células eucariotas. Ellos, junto con los microtúbulos y microfilamentos de actina, constituyen el citoesqueleto. Aunque la mayoría de los filamentos intermedios son estructuras estables, en los fibroblastos, la vimentina existe como una estructura dinámica. Este filamento se utiliza como un marcador de los tejidos que se derivan del mesodermo, y como tal se utiliza como un marcador inmunohistoquímico para los sarcomas.

Hertig y colaboradores (Hertig y otros, J Am Soc Nephrol. 2008 agosto; 19(8):1584-91) investigaron si la transición epitelial-a-mesenquimal en las células epiteliales tubulares renales de pacientes con nefropatía crónica del aloinjerto podía predecir la progresión de la fibrosis en el aloinjerto y midieron la expresión de vimentina en 83 biopsias de estos. Ellos encontraron una asociación entre la expresión elevada de la vimentina y la puntuación de la fibrosis intestinal a 1 año después de la cirugía.

5 En otro estudio de la fibrosis hepática, Meriden y colegas (Meriden y otros, Clin Gastro & Hepatol 2010; 8:289-296) encontraron una asociación significativa entre la expresión de la vimentina (en biopsias que se obtuvieron en la etapa F0) y la progresión de la fibrosis, donde los niveles elevados predijeron la rápida progresión de la fibrosis hepática.

En consecuencia, quisimos investigar si los fragmentos de vimentina circulantes podrían servir como biomarcadores sensibles y específicos de la fibrosis.

10 Proteoglicanos

15 Los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas, que unen covalentemente un número variable de cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG) a una proteína núcleo ¹⁶. Estos GAGs son polímeros de repeticiones de disacárido (por ejemplo, N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina), que son ácidos (cargados negativamente) debido a los grupos laterales sulfatados y carboxilados, e hidroxilo en las unidades de disacárido. Esto los hace altamente hidrofílicos, ayudando así a la difusión del agua y de los iones positivos (por ejemplo, el sodio de los fluidos extracelulares) ¹⁷. Además, los GAGs tienen la capacidad de formar enlaces no covalentes con por ejemplo las cadenas de ácido hialurónico para formar complejos moleculares aún mayores ¹⁶. La Tabla 4 enumera los proteoglicanos más estudiados que se asocian con el tejido conectivo.

Tabla 4. Proteoglicanos de la matriz extracelular del tejido conectivo

Grupo	Proteoglicanos	Origen	Función
Proteoglicanos extracelulares grandes (<i>mediante la agregación y la unión de hialuronano</i>)	agrecano ¹⁸	Condrocitos del cartílago articular, disco intervertebral, cartílago nasal	Estabilidad de la matriz extracelular (unión de hialuronano)
	Versicano ^{19, 20}	Tejido conectivo: fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso, células mesangiales	Interacciones célula-célula y célula-matriz Unión de azúcares en forma Ca-dependiente
	Neurocano ²¹	Tejido nervioso	Se une a las moléculas de adhesión de las células neuronales
	Brevicano ²²	Tejido nervioso	Estabilidad de la matriz extracelular
Proteoglicanos pequeños ricos en leucina (<i>colágeno-aglutinante</i>)	Decorina ²³	Tejido conectivo, cartílago, hueso	Se une a y conecta las moléculas de colágeno (estabilización de la matriz y grosor) Unión en la organogénesis de TGFβ
	Biglicanos ²⁴	Endotelio capilar, piel (queratinocitos), epitelio del riñón	La diferenciación celular une y conecta las fibras de colágeno
	Fibromodulina ¹⁷	Tejido conectivo, hueso, cartílago	Orientación regulada de las fibras de colágeno
	Lumicano ²³	Cornea, músculo, cartílago, riñón,	Controla el espaciado y el espesor de
		pulmón, intestino	fibras de colágeno
Proteoglicanos asociados a células	Serglicinas ²⁵	Se distribuye de manera amplia a los compartimientos intercelulares del endotelio	Diferenciación de las células hematopoyéticas Adhesión y activación de las células linfoides
	Sindecanos ²⁶	Se distribuye de manera amplia - frecuentemente se une a la membrana celular	Une colágenos, fibronectina, trombospondina, tenascina y bFGF
	Betaglicano ²⁷	Se distribuye de manera amplia	Receptor de TGFβ y señalización Posible reservorio de TGFβ
Proteoglicanos de la membrana basal	Perlecano ²⁸	Todas las membranas basales	Barrera selectiva para macromoléculas Adhesión celular

Proteína C-reactiva

La proteína C-reactiva (CPR) es una proteína de suero de la fase aguda que se produce por el hígado en respuesta a diferentes condiciones clínicas tales como, inflamación, infección o trauma²⁹. La producción de CPR se induce por citocinas

tales como la IL-6, que se libera de los tejidos afectados o dañados. El papel fisiológico de la CRP se desconoce aun y discusiones sobre su acción pro- o anti-inflamatoria están en curso.

Proteasas

5

El desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la ECM durante la fibrogénesis, resulta de la conversión de la matriz subendotelial de baja densidad en la matriz rica en colágenos intersticiales. El aumento de colágeno y proteoglicanos puede deberse a uno o ambos de (1) una disminución en la producción de la proteína y (2) la alteración de la degradación de proteínas, y por tanto menos degradación de la matriz. La disminución de la degradación de proteínas recibe recientemente mayor atención. En la regulación de este proceso las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs) desempeñan funciones importantes, así como también otras proteasas y sus inhibidores, tales como las cisteína proteasas y las cistatinas.

10

MMPs

15

Las MMPs son un grupo grande de endopeptidasas, capaces de degradar la mayoría sino todos los componentes de la ECM. Actualmente, se encontraron más de 25 MMPs. Las MMPs se caracterizan por un sitio activo que contiene un átomo de metal, típicamente zinc, y se secretan como zimógenos. Diferentes MMPs se expresan en diferentes tejidos. En la Tabla 5 se muestran MMPs en el hígado.

20

Tabla 5. MMPs en el hígado³⁰⁻³²

25

Familia	Proteasa	Fuente	Sustrato
Colagenasas	MMP-1	HSC	I, II, III, VII, VIII, X, gelatina
	MMP-8	Neutrófilos	I, II, III, V, VII, X, gelatina
	MMP-13	HSC, MFB, KC	I, II, III, VII, X, gelatina
Estromelisin	MMP-3	HSC	III, IV, V, IX, X, XI, gelatina, laminina, fibronectina, proteoglicanos, glicoproteínas, elastina, pro-MMP-1/13
	MMP-10	HSC	III, IV, V, gelatina, elastina, agregano
	MMP-11	HC	PAI-1, actividad semanal frente a las proteínas de la matriz
Gelatinasas	MMP-2	HSC, MBF	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, laminina
	MMP-9	KC, HSC, HC	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, laminina
	MMP-7	HSC	Entactina, gelatina, elastina, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno
Metaloelastasa	MMP-12	Macrófagos	Elastina, gelatinas, IV, laminina, fibronectina, entactina, vitronectina, proteoglicano, proteína básica de mielina, α1-antitripsina
MT-MMP	MMP-14	HSC, MFB, KC	I, II, III, gelatina, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno, pro-MMP-2, pro-MMP-13
	MMP-15	HC, BDEC	Pro-MMP-2, fibronectina, tenascina, laminina, agregano, perlecano

50

Los TIMPs bloquean la actividad proteolítica de las MMPs mediante la unión a la MMP en una manera sustrato -y tejido-específica y a las metaloproteinasas tipo membrana 1 en un complejo trimolecular (Tabla 6). Durante la fibrosis los niveles TIMP aumentan dramáticamente, y los niveles de MMP aumentan modestamente o se mantienen relativamente estáticos (excepto los de la MMP-2), lo que de conjunto da una disminución de la degradación de los colágenos.

Tabla 6. TIMPs en el hígado³¹

Nombre	Fuentes	Metaloproteinasa inhibida
TIMP-1	HSC, MFB, KC, HC	Pro-MMP-9, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13
TIMP-2	KC, HSC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, proMMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-7
TIMP-3	HC	MT-MMP-1, MT-MMP-2, TACE, MMP-13

Proteína activadora de fibroblastos

La subunidad alfa de la Proteína de Activación de los Fibroblastos (FAPa o FAP, alfa) es una gelatinasa integral de membrana que pertenece a la familia de las serina proteasas. La FAPa es la subunidad alfa y la DPP4 (CD26) la subunidad beta de un complejo de proteinasa heterodimérico unido a la membrana que se conoce además como Gelatinasa de Membrana de Melanoma 170 kDa, Serina Proteinasa Integral de Membrana y Seprasa. Algunas células sólo elaboran homodímeros de FAPa, algunas sólo homodímeros de DPP4. El monómero es inactivo. La FAP, alfa se expresa de manera selectiva en los fibroblastos del estroma reactivos de los cánceres epiteliales, el tejido de granulación de la cicatrización de heridas, y las células malignas de los sarcomas de los huesos y de los tejidos blandos³³. Esta proteína se cree que participa en el control del crecimiento de los fibroblastos o en las interacciones mesenquimales-epiteliales durante el desarrollo, la reparación de tejidos, y la carcinogénesis epitelial. Se demostró que la expresión de FAP aumenta con el estadio de la fibrosis^{34, 35}.

Biomarcadores de la fibrosis

Se sugirieron un número de marcadores bioquímicos para las enfermedades fibróticas, aunque el producto no es específico de la enfermedad. En la Tabla 7 se muestra un ejemplo de los marcadores bioquímicos de la fibrosis hepática utilizados en ensayos clínicos. Adicionalmente hay numerosos ejemplos de biomarcadores de otras enfermedades fibróticas^{12, 36-42}.

La Tabla 7 resume algunos de los marcadores de la fibrosis hepática que se conocen.

5	Biomarcadores	Parámetros	Enfermedad crónica del hígado	Referencia
	Un parámetro			
	CRP		NASH	43
10	Hialuronano		HCV	44-47
	IGF-I		HCV	48
	Leptina		HCV	49
15	PIIIP		HCV	50
	Varios parámetros	Parámetros	Enfermedad crónica del hígado	Referencias
	MP3	PIIINP, MMP1	HCV	51, 52
20	En el índice Zheng y otros	HA, PIIICP, PIIINP, Laminina, C-IV	Hepatitis crónica	53
	En el índice Lebensztjen y otros	Laminina-2, C-IV, MMP2, índice de MMP9-TIMP1	HBV	54
25		Tenascina, hialuronano, Colágeno VI, TIMP-1	HBV	55
	En el índice Tsochatzis y otros	Leptina, adiponectina, resistina	HCV, HBC, NASH	56

ES 2 529 101 T3

Biomarcadores	Parámetros	Enfermedad crónica del hígado	Referencia
En el índice Patel y otros	Hialuronano, TIMP-1, α_2 -macroglobulina	HCV	57
	TIMP-1, tenascina, colágeno IV, PIIINP, MMP2, laminina, Hialuronano	NASH	58
Índice de Fornis (76, 77)	Edad, conteo de plaquetas, γ GT, colesterol	HCV HIV/HCV	51, 59-62
FibroTest (76, 78)	Haptoglobina, α_2 -macroglobulina, apolipoproteína A1, γ GT, bilirubina	HCV HIV/HCV NAFLD NAFLD en pacientes de diabetes	45, 51, 60, 61, 63-75
Actitest	FibroTest + ALT	HCV	65, 76-78
APRI (Índice de Wai)	AST, conteo de plaquetas	HIV/HCV HCV NAFLD	45, 51, 60, 61, 64, 66, 79-87
Hepascore	Bilirubina, γ GT, hialuronano, α_2 -macroglobulina, edad, género	HCV HIV/HCV	51, 61, 64, 66, 88
FIB-4	Conteo de plaquetas, AST, ALT, edad	HIV/HCV	61, 83
SHASTA	Hialuronano, albúmina, AST	HIV/HCV	61
Fibroindex	FORN+APRI	HCV	89
Prueba con Fibrómetro	Conteo de plaquetas, índice de protrombina, AST, α_2 -macroglobulina, hialuronano, urea, edad	HIV/HCV HCV NAFLD	51, 61, 64, 66, 81
NFSA	Edad, hiperglicemia, índice de masa corporal, plaquetas, albúmina, AST/ALT	NAFLD	81
Ultrasonido + APRI		HCV	82
Metwally y otros index	Conteo de plaquetas, albúmina, AST, historia de transfusiones de sangre, anticuerpos contra la nucleoproteína del HBV	HCV	90
En el índice Mohamadnejad y otros	Edad, niveles de DNA del HBV, fosfatasa alcalina, albúmina, conteo de plaquetas, AST	HCV	91
FibroSpect II	Hialuronano, TIMP-1, α_2 -macroglobulina	HCV	85, 92, 93
Algoritmos de combinaciones por etapas	Combinación del APRI y del Fibrotest	HCV	94
En el índice Imbert-Bismut	α_2 macroglobulina, AST, ALT γ GT, bilirubina total, albúmina, α_1 globulina, α_2 globulina, β globulina, γ globulina, apolipoproteína A ₁	HCV	95
Nunes y otros	Edad, Plaquetas, INR, CD4, AST/ALT, Hialuronano, YKL-40, PIIINP	HCV/HIV HCV	96
Fibroscan +++	Fibroscan, Fibrotest, APRI,	HCV	97

- 5 La patente US5387504 describe el neo-epítipo VDIPEN que se libera por la acción de la estromelina en el sitio N₃₄₁-F₃₄₂ del agregano y un ensayo RIA que emplea un anticuerpo monoclonal específico para este neo-epítipo. Más generalmente se describe el uso de anticuerpos mono-específicos para los fragmentos de agregano, que se generan por el clivaje de una estromelina específica. Las elevaciones de la estromelina se producen en la osteoartritis, la artritis reumatoide, las lesiones ateroscleróticas, la gota, la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), ciertos tipos de cáncer, las lesiones en las articulaciones, y numerosas enfermedades inflamatorias. Se informó que la estromelina se eleva en la fibrosis pulmonar idiopática, y se alega que el ensayo puede llevarse a cabo con la sangre u otros fluidos biológicos para detectar los productos del clivaje por la estromelina del agregano y que la cuantificación de tales fragmentos se puede utilizar para el diagnóstico en relación con la IPF así como también en relación con otras condiciones. Sin embargo, no existe evidencia de esto ni publicaciones posteriores en nuestro conocimiento que validen esta predicción. Dichos ensayos RIA están disponibles comercialmente desde muchos años atrás y no hay informes de su uso exitoso en diagnosticar o supervisar cualquier enfermedad fibrótica.
- 10
- 15 La Patente de Estados Unidos 7,225,080 describe un método para el diagnóstico de una enfermedad inflamatoria, fibrótica o cancerosa en un paciente mediante la medición de los valores de al menos cuatro marcadores bioquímicos que se seleccionan del grupo que consiste de α 2-macroglobulina, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gammaglutamil transpeptidasa), γ -globulina, bilirrubina total, albúmina, α 1-globulina, α 2-globulina, haptoglobina, β -globulina, apoA1, IL-10, TGF- β 1, apoA2, y apoB en el suero o plasma de dicho paciente, y subsecuentemente combinar dichos valores con el fin de determinar la presencia de fibrosis hepática y/o de lesiones necroinflamatorias en el hígado en dicho paciente. La patente no enseña la medición cuantitativa del fragmento de péptido que porta los neo-epítipos que se generan durante la enfermedad fibrótica.
- 20
- 25 La Patente de Estados Unidos 6,060,255 describe un método para diagnosticar el grado de fibrosis hepática, que comprende las etapas de medir la concentración de la forma de alto peso molecular del colágeno tipo IV en una muestra mediante la utilización de un anticuerpo que se une específicamente al colágeno tipo IV, y de relacionar la medición con el grado de fibrosis hepática. De nuevo, no se hace uso de los neo-epítipos que se producen por las enzimas proteolíticas que actúan en el cuerpo. La muestra se digiere en realidad con pepsina, lo que puede oscurecer el patrón natural de clivaje del colágeno en la muestra.
- 30
- 35 La Patente de Estados Unidos 4,628,027 (Gay) describe la producción de anticuerpos específicos para las proteínas del tejido conectivo y, más particularmente, la producción de anticuerpos monoclonales por los híbridos de células fusionadas contra los colágenos humanos y las enzimas que participan en la degradación del colágeno. Se describe el uso de anticuerpos monoclonales contra las proteínas del tejido conectivo para establecer el perfil de colágeno de muestras histológicas, citológicas y de fluidos biológicos. Sin embargo, la patente no describe la medición de las proteínas del tejido conjuntivo sobre la base de la unión de los anticuerpos a los neo-epítipos en dichas proteínas del tejido conectivo.
- 40
- 45 Guañabens N y otros, J Bone Miner Res, 1998⁹⁸ evaluaron los marcadores del recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX), C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) y N-terminal pro-péptido del colágeno de tipo I (PINP) en pacientes con cirrosis biliar primaria, una enfermedad con aumento de la fibrosis hepática. Los niveles de NTX, CTX y PINP se elevan en los pacientes en comparación con los controles y se correlacionan con la etapa histológica de la enfermedad. Los anticuerpos que se emplearon en el NTX se indujeron contra un sitio que se clivó por la catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo JYDGKGVG \downarrow . Los anticuerpos que se emplearon en el CTX se indujeron contra un sitio que se clivó por la catepsina K en el C-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo EKAHDGGR \downarrow . Estos marcadores se encuentran en los telopéptidos del colágeno tipo I y no en la parte interna (la parte de triple hélice) del colágeno tipo I. Los anticuerpos monoclonales que se emplearon para el ensayo del PINP se indujeron contra un epítipo interno en la secuencia del PINP que no es un neo-epítipo.
- 50
- 55 Møller S y otros, Gut., 1999⁹⁹ demostraron que el telopéptido reticulado C-terminal del colágeno de tipo I (ICTP) se elevó en los pacientes con cirrosis alcohólicas en comparación con los controles. El estudio que se describió demostró que un marcador bioquímico puede reflejar la fibrosis hepática. El anticuerpo policlonal ICTP se indujo contra el colágeno tipo I que se clivó por la tripsina y la colagenasa. Sin embargo, los anticuerpos no se unen a un neo-epítipo.
- Rosen HN y otros, Calcif Tissue Int, 2004¹⁰⁰ evaluaron los marcadores de recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX) y C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) en las mujeres que reciben el tratamiento de reemplazo hormonal (HRT). En el estudio se observó que los marcadores de recambio óseo disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos que se emplearon en el NTX se indujeron contra un sitio que se clivó por la catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo JYDGKGVG \downarrow . Los anticuerpos que se emplearon en el CTX se indujeron contra un sitio que se

clivó por la catepsina K en el C-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo EKAHDGGRJ. En contraste con la presente invención, estos anticuerpos se utilizaron para la evaluación del metabolismo óseo y no para la fibrosis.

5 Lein M y otros, Eur Urol, 2007 ¹⁰¹ evaluaron el uso de los marcadores de recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX) y C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) específicos para el neo-epítipo en pacientes con cáncer de próstata que recibieron ácido zoledrónico. En el estudio se observó que los marcadores de recambio óseo disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos que se emplearon en el NTX se indujeron contra un sitio que se clivó por la catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo JYDGKGVGJ. Los anticuerpos que se emplearon en el
10 CTX se indujeron contra un sitio que se clivó por la catepsina K en el C-terminal del colágeno tipo I y son dependientes del neoepítipo EKAHDGGRJ. En contraste con la presente invención, estos anticuerpos se utilizaron para la evaluación de lmetabolismo óseo durante la invasión de las metástasis óseas y no para la fibrosis.

15 El PIIINP se utilizó en una serie de estudios para evaluar la gravedad de la enfermedad fibrótica ¹⁰², en pacientes con fibrosis de la piel luego de un trauma por quemadura severo ¹⁰³, para la progresión de la enfermedad en cirrosis biliar primaria no cirrótica ¹⁰⁴, en la cirrosis biliar primaria y la hepatitis viral C crónica ¹⁰⁵.

El PIIINP y el ICTP se midieron en los pacientes con fibrosis del miocardio¹⁰⁶.

20 Muchos informes combinan un conjunto de marcadores bioquímicos para mejorar el valor predictivo del índice bioquímico. Once marcadores séricos diferentes se midieron en 205 pacientes con estadios fibróticos de F0 a F4, y los marcadores más informativos fueron la alfa 2 macroglobulina, la alfa2 globulina (o haptoglobina), la gammaglobulina, la apolipoproteína A1, la gamma glutamiltranspeptidasa, y la bilirrubina total ¹⁰⁷. Un índice de estos marcadores que tuvo un valor predictivo negativo (100 % de certeza de la ausencia de F2, F3, o F4) se obtuvo para las puntuaciones que varían de cero hasta 0.10 (12 % [41] de todos los pacientes), y un alto valor predictivo positivo (> 90 % de certeza de la presencia de F2, F3, o F4) para las
25 puntuaciones que varían de 0.60 a 1.00 (34 % [115] de todos los pacientes).

30 Sin embargo, en ninguno de los informes que se mencionan anteriormente se sugiere que las mediciones de los fragmentos de péptidos que se basan en la unión de anticuerpos a neo-epítipos como se reclama ahora podrían ser útiles para la evaluación de pacientes con enfermedad fibrótica.

La patente US2007/099242 describe el uso del C3dg que se encontró en los biofluidos de los pacientes para el diagnóstico de las CVD.

35 La patente WO2009/059972 describe los ensayos de diagnóstico de la aterosclerosis en base a los neo-epítipos del colágeno tipo III.

Hisae y otros, Molecular Immunology, vol. 29, núm. 6, 1 junio 1992 (192-06-01), págs 759-770 describe los anticuerpos que se indujeron contra fragmentos del colágeno de tipo III que se utiliza en un ELISA.

40 Von Muhlen C. Z. y otros, Journal of Proteome Research vol. 8, núm. 1, enero 2009, págs 335-345 describe que los fragmentos del colágeno α 1 (I y III) se encontraron en la orina de pacientes con placas ateroscleróticas.

45 La patente US2003/119058 y la patente US6323314 describen los métodos inmunogénicos para los ensayos de muestras de fragmentos de colágeno en los fluidos corporales humanos.

50 La presente invención proporciona ahora un método de diagnóstico o cuantificación de la fibrosis que no sea como un diagnóstico o cuantificación de la aterosclerosis, que comprende, la realización de un inmunoensayo en una muestra de biofluido que se obtiene del paciente para medir los fragmentos de proteínas que contienen neo-epítipos naturalmente presentes en dicha muestra, y asociando una elevación de dicha medida en dicho paciente por encima de un nivel normal con la presencia o el grado de la fibrosis, en donde dicho inmunoensayo se lleva a cabo por un método que comprende:

55 poner en contacto los fragmentos de las proteínas presentes naturalmente en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica específicamente reactiva con un neo-epítipo N-terminal que se forma por el clivaje de una proteína por una proteinasa o un neo-epítipo C-terminal que se forma por la escisión de una proteína por una proteinasa cuya pareja de unión inmunológica es no reactiva con la proteína intacta de la que se deriva el epítipo, y medir el grado de unión de los fragmentos peptídicos a dicha pareja de unión inmunológica para medir en los mismos los fragmentos de proteínas que comprenden dicho neo-epítipo, y en donde dicha proteína es el colágeno de tipo III. A estos efectos, la enfermedad

cardiovascular puede no considerarse como fibrosis, o la fibrosis que se detecta de acuerdo con la invención puede ser diferente a la fibrosis acompañante de la enfermedad cardiovascular.

Opcionalmente, un resultado elevado en un inmunoensayo de acuerdo con esta invención se asocia con la fibrosis de la piel, la fibrosis pulmonar, o la fibrosis hepática.

5

Dicha pareja de unión inmunológica puede tener afinidad de unión específica por fragmentos de péptidos que comprenden un neoepítipo C-terminal o un neoepítipo N-terminal.

10

La reactividad específica con o la afinidad inmunológica por un neo-epítipo implicará que la pareja de unión inmunológica relevante no es reactiva con la proteína intacta del que deriva el neo-epítipo. Preferentemente, dicha pareja de unión inmunológica no es reactiva con una secuencia del neo-epítipo, tal como una secuencia de las que se enumeran más abajo, si la secuencia se prolonga más allá del respectivo sitio de clivaje.

15

El término "pareja de unión inmunológica", como se utiliza en la presente invención incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y además fragmentos de unión específicos de anticuerpos tales como los Fab o F(ab')₂. Así, dicha pareja de unión inmunológica puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión específica.

20

Preferentemente, la secuencia del neo-epítipo al que la pareja de unión inmunológica se une no se encuentra en ninguna otra proteína o no se encuentra en ninguna de las otras proteínas a las que el método de la invención se refiere.

Varias proteasas candidatas pueden ser responsables de la digestión de las proteínas en los tejidos fibróticos. Probablemente, esto es el resultado de la gran variedad de procesos complicados que resultan en diferentes perfiles de neo-epítipos que dependen de los niveles de enfermedad.

25

Colágeno tipo III

Determinamos que las enzimas que se enumeran en la siguiente tabla clivan el colágeno tipo III en al menos los siguientes sitios de corte (marcados *):

30

Tabla 11. Sitios de clivaje en colágeno tipo III

35

Proteasa	Neo-Epítipo
MMP-1	A*GTFGAPGLMGARGFPGPA*G SEQ ID NO178
MMP-1	K*GDFGPPGIPGRNGDPGI*P SEQ ID NO179
MMP-1	G*LAGPPGMPGPRGSPGPQG*V SEQ ID NO180
MMP-1	G*ERGLPGPPGIKGPAGIPGF*P SEQ ID NO181
MMP-1	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO182
MMP-1	G*IKGHRGFPGNPGAPGSPGPAG*Q SEQ ID NO183
MMP-1	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K SEQ ID NO184
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V SEQ ID NO185
MMP-1	I*TGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K SEQ ID NO186
MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQG*V SEQ ID NO187
MMP-1	G*VKGESGKPGANGLSGERGPPGPQG*L SEQ ID NO188
MMP-1	G*SRGAPGPQGPGRGDKGETGERGAAG*I SEQ ID NO189

50

55

ES 2 529 101 T3

	MMP-1	P*KGDAGQPGEKGSFGAQGPPGAPGPLG*I SEQ ID NO190
	MMP-1	G*ITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K SEQ ID NO191
	MMP-1	G*LRGGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPGAAGTPG*L SEQ ID NO192
5	MMP-1	G*HACAQGPFGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIPGAPG*L SEQ ID NO193
	MMP-1	A*GKSGDRGESGPAGPAGAPGPAGSRGAPGPQCPRGDKGETGERGAAG*I SEQ ID NO194
10	MMP-1	G*LQCLPGTGGPPGENGKPGEPGPKGDAGAPGGKGDAGAPGERGPPG*L SEQ ID NO195
	MMP-3	G*ERCLPGPPGIKGPAGIPGF*P SEQ ID NO196
15	MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGT*S SEQ ID NO197
	MMP-3	K*DGTSGHPPGPIGPPGPRGNRGER*G SEQ ID NO198
	MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGTSGHPG*S SEQ ID NO199
20	MMP-3	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO200
	MMP-3	A*PGAPGGKGDAGAPGERGPPGLAGAPGLRG*G SEQ ID NO201
	MMP-3	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGTSGHPGSPG*S SEQ ID NO202
25	MMP-2	A*IGSPGPAGPRGPFVGPSPGPPG*K SEQ ID NO203
	MMP-3 + -8	G*AIGSPGPAGPRGPFVGPSPGPPG*K SEQ ID NO204
	MMP-8	P*AGQQGAIGSPGPA*G SEQ ID NO205
30	MMP-8	G*GPPGVAGPPGSGPAGPP*G SEQ ID NO206
	MMP-8	L*AGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO207
	MMP-8	G*LSGERGPPGPPQGLPGLA*G SEQ ID NO208
35	MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO209
	MMP-8	G*LACPPGMPGPRGSPGPQGV*K SEQ ID NO210
40	MMP-8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*K SEQ ID NO211
	MMP-8	G*PQGPFGKNGETGPQGPFGP*T SEQ ID NO212
	MMP-8	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGAR*G SEQ ID NO213
45	MMP-8	A*RGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO214
	MMP-8	N*GLSGERGPPGPPQGLPGLAGTA*G SEQ ID NO215
	MMP-8	A*VGGLAGYPGPAGPPGPPGPPGT*S SEQ ID NO216
50	MMP-8	G*SPGGKGMGPAGIPGAPGLMGA*R SEQ ID NO217
	MMP-8	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO218
	MMP-8	V*KGESGKPGANGLSGERGPPGPQGV*L SEQ ID NO219
55	MMP-8	G*VKGERGSPGGPGAAGFPGARGLPFPFGSKNGNPPGPPGSPGKDGPPGPAG*N SEQ

ES 2 529 101 T3

	ID NO220
5	MMP-8 G*SPGAQGP?GAP?GPLGIAGITGARCIAGPPG*M SEQ ID NO221
	MMP-8 R*GAPGEKGE?G?PGVAGPPGGSGPAGPPGPQ*G SEQ ID NO222
	MMP-8 R*GAPGEKGE?G?PGVAGPPGGSGPAGPPGPQ*G SEQ ID NO223
10	MMP-8 G*IAGITGARCIAGPPGMPGPRGSPGPQ*V SEQ ID NO224
	MMP-9 G*IKGPAGIP?GFPG*M SEQ ID NO225
	MMP-9 G*QPGVMGF?GPKG*N SEQ ID NO226
15	MMP-9 G*IKGPAGIP?GFPGMK*G SEQ ID NO227
	MMP-9 G*IKGPAGIP?GFPGMK*H SEQ ID NO228
	MMP-9 I*PGAPGLMGARGPPGPAG*A SEQ ID NO229
20	MMP-9 G*ERGLPGP?GIKGPAGIP*G SEQ ID NO230
	MMP-9 G*IPGAPGLMGARGPPGPAG*A SEQ ID NO231
	MMP-9 G*FRGPAGPNGIPGEKGPAG*E SEQ ID NO232
	MMP-9 P*GIPGQPGSPGSPGPPGIC*E SEQ ID NO233
25	MMP-9 G*ERGLPGP?GIKGPAGIPGL*P SEQ ID NO234
	MMP-9 A*VGGLAGY?GPAGPPGPPGPPG*T SEQ ID NO235
	MMP-9 G*VKGERGSPGG?GAAGFP?GARG*L SEQ ID NO236
30	MMP-9 G*DAGAPGAPGGKGDAGAPGERGPPG*L SEQ ID NO237
	MMP-9 Q*GPPGPTGPGGDKGDTGPPGPQGL*Q SEQ ID NO238
	MMP-9 G*INGSPGGKCEMGPAGIPGAPGLM*G SEQ ID NO239
35	MMP-9 Q*GPPGEPGQAGPSGPPGPPGAIGPS*G SEQ ID NO240
	MMP-9 P*GPPGINGSPGGKCEMGPAGIPGAP*G SEQ ID NO241
	MMP-9 R*GLPGPPGNSGNTGPPGSPGSPGKDCPPGPAG*N SEQ ID NO242
40	MMP-9 G*KNGET?GPQGP?GPTGPGGDKGDTGPPGPQ*G SEQ ID NO243
	MMP-9 G*LPGIAGPRGSPGERGETGPPGPAGFP?GAP*Q SEQ ID NO244
	MMP-9 G*INGSPGGKCEMGPAGIPGAPGLMGARGPPGPAG*A SEQ ID NO245
45	MMP-9 P*GINGSPGGKCEMGPAGIPGAPGLMGARGPPGPAG*A SEQ ID NO246
	MMP-9 P*PGENGKPGEP?GPKGDAGAPGAPGGKGDAGAPGERGPPG*L SEQ ID NO247
	MMP-9 G*LKGENGLPGENGAPGPMGPRGAPGERGR?GLPGAAG*A SEQ ID NO248
50	MMP-9 G*NTGAPGSPGVS?GPKGDAGQ?GKEKSPGAQ?GPPGAP?GLG*I SEQ ID NO249
	MMP-9 G*LMGARGP?G?PAGANGAPGLRGGAGEPGKNGAKGEP?GPRG*E SEQ ID NO250
55	MMP-9 G*LRGAGP?GPEGGKGAAGPPGPPGAAGT?GLQGM?GERGGLGSPGPKG*D SEQ ID NO251

5	MMP-8 y -9	G*QQGAIGSPGAPGRGPVGFSGPPG*K SEQ ID NO252
	MMP-9	K*GDFGPPGIPGRNGDFGIPGQPG*S SEQ ID NO253
	MMP-9	G*LRGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPG*A SEQ ID NO254
10	MMP-9	G*KNGETGPQGFPGPTGPGGDKGDTGPPGPQG*L SEQ ID NO255
	MMP-9	G*YQGPPEPGQAGPSGPPGPPG*A SEQ ID NO256
	MMP-9	G*VAGPPGSGPAGPPGPQG*V SEQ ID NO257
15	MMP-8, -9 y -13	G*DKGEPGGGADGVPGKDGFRGPTGPIGPPGPAG*Q SEQ ID NO258
	ADAMTS-5	Q*GHAGAQQGPPPPGIN*G SEQ ID NO259
20	CatepsinaK	A*GERGAPGPA*G SEQ ID NO260
	CatepsinaK	A*GIPGFPGMK*G SEQ ID NO261
	CatepsinaK	F*PGMKGHRGFD*G SEQ ID NO262
	CatepsinaK	G*TPGARGLPGPPG*S SEQ ID NO263
25	CatepsinaK	A*GFPGARGLPGPPG*S SEQ ID NO264
	CatepsinaK	F*PGPPGPPGTSGHP*G SEQ ID NO265
	CatepsinaK	G*TPGMKGHRGFD*G SEQ ID NO266
30	CatepsinaK	Q*PGDKGEGGAPGLPGI*A SEQ ID NO267
	CatepsinaK	R*GDKGETGERGAAGIK*G SEQ ID NO268
	CatepsinaK	D*GRNGEKGETGAPGLK*G SEQ ID NO269
35	CatepsinaK	A*GQPGDKGEGGAPGLPGIA*G SEQ ID NO270
	CatepsinaK	G*GPPGENGKPGEPGPKGD*A SEQ ID NO271
	CatepsinaK	A*GIPGFPGMKGHRGFD*G SEQ ID NO272
40	CatepsinaK	R*GGAGEPGKNGAKGEPGPR*G SEQ ID NO273
	CatepsinaK	K*GERGSPGGPGAAGFPGARGLPGPP*G SEQ ID NO274
	CatepsinaK	L*PGVPGAKGEDGKDGSPGEPGANGLP*G SEQ ID NO275
45	CatepsinaK	G*AAGFPGARGLPGPPGSGNPNPFPGPS*G SEQ ID NO276
	CatepsinaK	R*PGPPGSPGPRGQPGVMGFPGPKGN*D SEQ ID NO277
	CatepsinaK	Q*GPPGPPGINGSPPGKGEKMPAGIPGAP*G SEQ ID NO278
50	CatepsinaK	A*GKDGESGRPGRPGERGLPGPPGKIK*G SEQ ID NO279
	CatepsinaK	A*GARGNDGARGSDGQPPGPPGPTAGFPG*S SEQ ID NO280
	CatepsinaK	S*PGVSGPKGDAGQPGKGSPPGQPPGAPG*P SEQ ID NO281
55	CatepsinaK	R*GSDGQPPGPPGPTAGFPGPSFGAKGEVGA*G SEQ ID NO282

ES 2 529 101 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

CatepsinaK	Q*GPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIPGAPGLM*G SEQ ID NO283
CatepsinaK	A*GPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQGPPEPG*Q SEQ ID NO284
CatepsinaK	F*PGAPQNGEPGGKGERGAPGEKGEKGGPPGVA*G SEQ ID NO285
CatepsinaK	A*GFPGAPGQNGEPGGKGERGAPGEKGEKGGPPG*V SEQ ID NO286
CatepsinaK	A*GARGNDGARGSDQPGPPGPPGTAGFPGSPGAKGEVGPFA*G SEQ ID NO287
CatepsinaK	R*GAAGEPGRDGVPGGPGMRGMPGSPGGPGSDGKPGPPGSGGESGRPGPPGPS*G SEQ ID NO288
CatepsinaS	G*IAGITGARGI*A SEQ ID NO289
CatepsinaS	A*GPPGPPGAAGTPGLQG*M SEQ ID NO290
CatepsinaS	N*GLSGERGPPGPQGLPG*L SEQ ID NO291
CatepsinaS	M*GARGPPGPAGANGAPGLR*G SEQ ID NO292
CatepsinaS	N*GLSGERGPPGPQGLPGLA*G SEQ ID NO293
CatepsinaS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRG*S SEQ ID NO294
CatepsinaS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQC*V SEQ ID NO295
CatepsinaS	R*GGAGPPGPEGGKGAAGPPGPPGAAGTPGLQ*G SEQ ID NO296
CatepsinaS	S*GPKGDAGQPGEKGSPPGAQGGPPGAPGLG*I SEQ ID NO297
CatepsinaS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVX*G SEQ ID NO298
CatepsinaS	S*GPKGDAGQPGEKGSPPGAQGGPPGAPGLG*I SEQ ID NO299
CatepsinaS	G*IAGITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVX*G SEQ ID NO300
CatepsinaS	A*VGGLAGYPGAPGPPGPPGPPGTSGHPGSPGSPGYQ*G SEQ ID NO301
CatepsinaS	E*PGPQGHAGAQQPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAGIPGAPG*L SEQ ID NO302
ADAMTS1	I*PGFPGMKGHR*G SEQ ID NO303
ADAMTS1	R*GSPGGPGAAGFPGAR*G SEQ ID NO304
ADAMTS1	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO305
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G SEQ ID NO306
ADAMTS1	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO307
ADAMTS1	L*GIAGITGARGLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO308
ADAMTS1	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G SEQ ID NO309
ADAMTS1	Q*GPPGPPGINGSPPGKKGEMGPAG*I SEQ ID NO310
ADAMTS1	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO311
ADAMTS1	A*GITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G SEQ ID NO312
ADAMTS1	T*GARGIAGPPGMPGPRGSPGPQGVK*C SEQ ID NO313
ADAMTS1	R*GLPFPPIKGPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO314

ES 2 529 101 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

ADAMTS1	G*RPGLPGAAGARGNDGARGSDGQPGPPG*P SEQ ID NO315
ADAMTS1	N*GAPGPMGPRGAPGERGRPGLPGAAGAR*G SEQ ID NO316
ADAMTS1	A*GSRGAPGPGQPRGDKGETGERGAAGIK*G SEQ ID NO317
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G SEQ ID NO318
ADAMTS1	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGL*S SEQ ID NO319
ADAMTS1	P*GPPGNSGNKPGPPGSPGPKDGPAGNTGAPGS*P SEQ ID NO320
ADAMTS1	T*GARGLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G SEQ ID NO321
ADAMTS1	R*CAPGEKGEKGGPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGER*G SEQ ID NO322
ADAMTS1	G*GPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGERGSPGGPGAAGF*P SEQ ID NO323
ADAMTS1	K*SGDRGESGPAGPAGAPGAGSRGAPGPGQPRGDKGETGERGAAGIK*G SEQ ID NO324
ADAMTS4	I*PGFPGMKGHR*G SEQ ID NO325
ADAMTS4	R*CLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO326
ADAMTS4	G*PQGLQGLPGTGGPP*G SEQ ID NO327
ADAMTS4	K*GPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO328
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGV*V SEQ ID NO329
ADAMTS4	G*GPPGENKPGEPGPKGDAGAP*G SEQ ID NO330
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G SEQ ID NO331
ADAMTS4	E*KGSFGAQGPPGAPGPLGIAGITGAR*G SEQ ID NO332
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO333
ADAMTS4	R*GAPCFRGPAGPNGIPGEKGPAGER*G SEQ ID NO334
ADAMTS4	R*GLPFPPIKGPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO335
ADAMTS4	R*GPVCPSPGPKDGTSCHPGPIGPPGPR*G SEQ ID NO336
ADAMTS4	A*PGPQGPARGDKGETGERGAAGIKGHR*G SEQ ID NO337
ADAMTS4	R*GAPGPGQPRGDKGETGERGAAGIKGHR*G SEQ ID NO338
ADAMTS4	R*GFCNPGAPGSPGPAGQQGAIGSPGAPGR*G SEQ ID NO339
ADAMTS4	L*PGPPGIKGPAGIPGFPGMKGHRGFDGR*N SEQ ID NO340
ADAMTS4	D*AGQPGEKGSFGAQGPPGAPGPLGIAGITGAR*G SEQ ID NO341
ADAMTS4	R*GPTGPIGPPGAPGQPGDKGEGGAPGLPGIAGPR*G SEQ ID NO342
ADAMTS4	K*GDAGQPGEKGSFGAQGPPGAPGPIGTAGITGAR*G SEQ ID NO343
ADAMTS4	R*NGEKGETGAPGLKGENGLPGENGAPGPMGPR*G SEQ ID NO344
ADAMTS4	A*PGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGAPGRGA*A SEQ ID NO345
ADAMTS4	R*GAPCFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGAPGR*G SEQ ID NO346

ES 2 529 101 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

ADAMTS4	R*GSPGERGETGPPGPAGFPAGPQNGEPGGKGER*G SEQ ID NO347
ADAMTS4	G*HAGAQQPPPGINGSPGGKGMGPAGIPGAPGLMG*A SEQ ID NO348
ADAMTS4	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGLSGER*G SEQ ID NO349
ADAMTS8	L*GIAGITGARGL*A SEQ ID NO350
ADAMTS8	I*PGFPGMKGHR*G SEQ ID NO351
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO352
ADAMTS8	Q*GPPGAPGPLGIAGITGAR*G SEQ ID NO353
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPR*G SEQ ID NO354
ADAMTS8	A*GIPGAPGLMGARGPPGPAGAN*G SEQ ID NO355
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVK*E SEQ ID NO356
ADAMTS8	K*GSPGAQQPPGAPGPLGIAGITGAR*G SEQ ID NO357
ADAMTS8	L*PGPPGIXGPAGIPGFPGMKGHR*G SEQ ID NO358
ADAMTS8	K*DGTSGHPGPIGPPGPRGNRGER*G SEQ ID NO359
ADAMTS8	A*GITGARGLAGPPGMPGPRGSPGPQ*G SEQ ID NO360
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESG*K SEQ ID NO361
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGAN*G SEQ ID NO362
ADAMTS8	R*GLAGPPGMPGPRGSPGPQGVKGESGKPGANGL*S SEQ ID NO363
ADAMTS8	P*GPPGNSNGNPPGPPGSGSPCKDGPAGNTCAPGS*P SEQ ID NO364
ADAMTS8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGER*G SEQ ID NO365
ADAMTS8	K*SGDRGESGPAGPAGAPGAPGSRGAPGPQGPGRDKGETGERGA*A SEQ ID NO366
ADAMTS8	R*GAPGEKGEPPGVAGPPGSGPAGPPGPQGVKGERGSPGGPGAAGFPGAR*G SEQ ID NO367
MMP9	_ *AIGPSG _ _ * SEQ ID NO368
MMP9	117' PGIPGRNGDP* . 124' SEQ ID NO369
MMP9	142' . *ESCPTGPQNY 151' SEQ ID NO370
MMP9	113' PKGDTGPRGP* . ' 122 SEQ ID NO371

50

55

La pareja de unión inmunológica puede ser una reactiva específicamente con un neopéptido C-terminal o N-terminal que se forma por el clivaje del colágeno de tipo III.

Las parejas de unión inmunológica adecuadas pueden ser por lo tanto específicamente reactivas con cualquiera de las siguientes secuencias en el N terminal de un péptido:

Tabla 12. Secuencias N-terminal de fragmentos peptídicos generados de proteasa de colágeno tipo III

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Colágeno tipo III		
GIPGAP SEQ ID NO372	GDPGPP SEQ ID NO373	LAGPPG SEQ ID NO89
IAGITG SEQ ID NO375	IKGHRG SEQ ID NO376	RGLAGP SEQ ID NO377
TGARGL SEQ ID NO378	ITGARG SEQ ID NO379	VKGESG SEQ ID NO380
KGDAGO SEQ ID NO381	LRGGAG SEQ ID NO382	ERGLPG SEQ ID NO385
GKSGDR SEQ ID NO383	LQGLPG SEQ ID NO384	AIGSPG SEQ ID NO143
DGTSQH SEQ ID NO135	VGGLAG SEQ ID NO155	LSGERG SEQ ID NO176
GPPGVA SEQ ID NO158	AGPPGM SEQ ID NO145	IGSPGP SEQ ID NO386
GLSGER SEQ ID NO387	GLAGPP SEQ ID NO388	PQGPPG SEQ ID NO389
GARGLA SEQ ID NO111	KGESGK SEQ ID NO374	VKGERG SEQ ID NO159
GAPGEK SEQ ID NO141	QPGVMG SEQ ID NO144	IKGPAG SEQ ID NO169
IPGAPG SEQ ID NO117	FRGPAG SEQ ID NO137	QQGAIG SEQ ID NO390
GPPGPT SEQ ID NO391	INGSPG SEQ ID NO392	GPPGEP SEQ ID NO393
GLPGPP SEQ ID NO394	KNGETG SEQ ID NO395	LPGIAG SEQ ID NO396
GINGSP SEQ ID NO397	PGENGK SEQ ID NO398	LKGENG SEQ ID NO399
LMGARG SEQ ID NO400	YQGPPG SEQ ID NO401	GERGAP SEQ ID NO402
DKGEPG SEQ ID NO403	GHAGAO SEQ ID NO404	GSDGQP SEQ ID NO405
PGMKGH SEQ ID NO406	FPGARG SEQ ID NO407	GFPGAR SEQ ID NO408
FPGMKG SEQ ID NO409	PGDKGE SEQ ID NO410	GDKGET SEQ ID NO411
GQPGDK SEQ ID NO412	GPPGEN SEQ ID NO413	GIPGFP SEQ ID NO414
GERGSP SEQ ID NO415	PGVPGA SEQ ID NO416	AAGFPG SEQ ID NO417
GPPGPP SEQ ID NO100	GKDGES SEQ ID NO418	GARGND SEQ ID NO419
GFPGAP SEQ ID NO420	NTGAPG SEQ ID NO437	GAAGEP SEQ ID NO421
IAGITG SEQ ID NO375	GLSGER SEQ ID NO387	GARGPP SEQ ID NO422
GPPGSN SEQ ID NO423	GPKGDA SEQ ID NO424	GGAGPP SEQ ID NO425
PGPQGH SEQ ID NO426	PGFPCM SEQ ID NO427	GSPGGP SEQ ID NO428
SGDRGE SEQ ID NO429	GITGAR SEQ ID NO430	GIAGIT SEQ ID NO431
PGPPGI SEQ ID NO432	ESCPTG SEQ ID NO433	HAGAQG SEQ ID NO434
GAPGFR SEQ ID NO435	RPGLPG SEQ ID NO436	GAPGPM SEQ ID NO438
GSPGER SEQ ID NO439	PQGLQG SEQ ID NO440	GPAGIP SEQ ID NO441

5

10

15

20

AIGPSG SEQ ID NO368	PGFRGP SEQ ID NO443	KGSPGA SEQ ID NO444
GAPGPQ SEQ ID NO445	GFPGNP SEQ ID NO446	GPVGPS SEQ ID NO447
GPTGPI SEQ ID NO448	GDAGQP SEQ ID NO449	NGEKGE SEQ ID NO450
SRGAPG SEQ ID NO451	VAGPPG SEQ ID NO452	PGPQGP SEQ ID NO453
AGQPGE SEQ ID NO454	PGAPGG SEQ ID NO455	PGAPGQ SEQ ID NO456
AGQQGA SEQ ID NO457	PGPPGP SEQ ID NO458	SPGGKG SEQ ID NO459
GARGLA SEQ ID NO111	GRNGEK SEQ ID NO460	GPPGAP SEQ ID NO461
GSRGAP SEQ ID NO462	GGAGEP SEQ ID NO463	GSPGAQ SEQ ID NO464
SPGAQG SEQ ID NO465	PGVSGP SEQ ID NO466	PGAPGL SEQ ID NO467
GIPGQP SEQ ID NO468	DAGAPG SEQ ID NO469	GPPGIN SEQ ID NO470

o con cualquiera de las siguientes secuencias en el extremo C-terminal de un péptido:

Tabla 13. Secuencias C-terminal de fragmentos peptídicos generados de proteasa de colágeno tipo III

25

30

35

40

45

50

Colágeno tipo III		
GPPGPA SEQ ID NO94	NGDPGI SEQ ID NO471	SPGPQG SEQ ID NO472
GMPGPR SEQ ID NO473	SPGPAG SEQ ID NO474	PGPQGV SEQ ID NO475
ERGAAG SEQ ID NO476	PGPLGI SEQ ID NO477	AAGTPG SEQ ID NO478
ERGPPG SEQ ID NO147	PGPPGT SEQ ID NO479	GNRGER SEQ ID NO480
	APGLRG SEQ ID NO481	HPGSPG SEQ ID NO482
PSGPPG SEQ ID NO483	GSPGPA SEQ ID NO484	GPAGPP SEQ ID NO485
GLPGLA SEQ ID NO486	GPPGPQ SEQ ID NO490	QGPPGP SEQ ID NO487
GLAGTA SEQ ID NO488	FPGPKG SEQ ID NO491	PGLMGA SEQ ID NO489
LAGPPG SEQ ID NO89	GPAGIP SEQ ID NO441	FPGARG SEQ ID NO407
IPGFPG SEQ ID NO492	PPGPPG SEQ ID NO119	GFPGMK SEQ ID NO493
FPGAPG SEQ ID NO494	GAIGPS SEQ ID NO495	AGIPGF SEQ ID NO496
GPPGIC SEQ ID NO2187	LPGAAG SEQ ID NO2188	APGPLG SEQ ID NO2189
PGPQGL SEQ ID NO497	GAPGLM SEQ ID NO498	GPPGIN SEQ ID NO470
SPGPKG SEQ ID NO499	GEPGPR SEQ ID NO500	IPGQPG SEQ ID NO501
TGAPGS SEQ ID NO502	GHRGFD SEQ ID NO503	LPGPPG SEQ ID NO72
PGPKGD SEQ ID NO506	PGLPGI SEQ ID NO504	GAAGIK SEQ ID NO505

55

	GLPGIA SEQ ID NO507	PQGLPG SEQ ID NO508	GAPGLR SEQ ID NO509
	GLPGPP SEQ ID NO394	GANGLP SEQ ID NO510	GPPGPS SEQ ID NO511
5	IPGAPG SEQ ID NO117	GPPGIK SEQ ID NO512	TAGFPG SEQ ID NO513
	GEVGPA SEQ ID NO514	PPGPQG SEQ ID NO103	GPPGVA SEQ ID NO158
	GEVGPA SEQ ID NO499	GFPGAR SEQ ID NO408	TGARGL SEQ ID NO378
10	EKGPAG SEQ ID NO515	EPGPRG SEQ ID NO516	PPGAPG SEQ ID NO517
	TSGHPG SEQ ID NO518	GAPGPA SEQ ID NO519	TPGLQG SEQ ID NO520
	GTPGLQ SEQ ID NO521	GTSGHP SEQ ID NO522	MPGPRG SEQ ID NO523
15	GPQGVK SEQ ID NO524	GAPGLK SEQ ID NO525	GSPGYQ SEQ ID NO526
	PPGPAG SEQ ID NO52	PGPKGN SEQ ID NO527	GAAGAR SEQ ID NO528
	FPGMKG SEQ ID NO409	PGANGL SEQ ID NO529	GTGGPP SEQ ID NO530
20	GLSGER SEQ ID NO387	TGPRGP SEQ ID NO177	GITGAR SEQ ID NO430
	GMKGHR SEQ ID NO531	EGGPPG SEQ ID NO532	GSPGPQ SEQ ID NO533
	EMGPAG SEQ ID NO534	GIAGPR SEQ ID NO535	QPGPPG SEQ ID NO536
25	GRNGDP SEQ ID NO171	GKPGAN SEQ ID NO537	VKGESG SEQ ID NO380
	GVKGER SEQ ID NO538	PGAAGF SEQ ID NO539	TGERGA SEQ ID NO540
30	PQGVKG SEQ ID NO541	GDAGAP SEQ ID NO542	GPAGER SEQ ID NO543
	GPPGPR SEQ ID NO544	GPAGPR SEQ ID NO545	RGFDGR SEQ ID NO546
	AGPRGA SEQ ID NO547	GGKGER SEQ ID NO548	APGLMG SEQ ID NO549
35	GPAGAN SEQ ID NO550		

40 Se pueden identificar sitios de clivaje adicionales que definen neo-epítopos que pueden ensayarse de una manera similar mediante la exposición del colágeno tipo III a cualquiera de las enzimas que se describen en la presente invención y el aislamiento y secuenciación de los péptidos que se producen de ese modo. Además, los ensayos se pueden basar en los neo-epítopos que se generan de manera adyacente a los sitios de clivaje que se ilustran, es decir, en las secuencias C-terminales que conducen a los epítopos N-terminales que se indican anteriormente y las secuencias N-terminales que se conectan con los epítopos C-terminales que se describen.

45 Los ensayos para más de uno de los péptidos que se describen anteriormente pueden llevarse a cabo por separado y sus resultados combinados o más de uno de los péptidos que se describen anteriormente se pueden medir juntos.

50 El resultado de un ensayo de acuerdo con la invención se puede combinar con uno o más de otros biomarcadores que se midieron para formar un índice compuesto de valor diagnóstico o pronóstico.

55 Generalmente, todos los formatos de inmunoensayos que se conocían previamente se pueden utilizar de acuerdo con esta invención lo que incluye los formatos heterogéneos y homogéneos, los ensayos tipo sándwich, los ensayos de competencia, los ensayos ligados a enzimas, los ensayos radio-inmunes y similares. Así, opcionalmente, dicho método se lleva a cabo como un inmunoensayo de competencia en el que dicha pareja de unión inmunológica y un agente de competencia se incuban en presencia de dicha muestra y el agente de competencia compete con los fragmentos de péptidos en la muestra para unirse a la pareja de unión inmunológica.

Dicho agente de competencia puede ser (1) un péptido sintético que se deriva de la secuencia de colágeno tipo III o un agente de competencia que se deriva de (2) un colágeno tipo III nativo purificado que se cliva por proteasas para revelar dicho neo-epítipo.

5

Un método adecuado podría ser un inmunoensayo de competencia que utilice anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de anticuerpos que se unan a los neo-epítipos del colágeno tipo III. Los péptidos sintéticos que se seleccionen adecuadamente recubiertos sobre la superficie sólida de una placa de microtitulación pueden competir con la muestra por la unión a los anticuerpos monoclonales o a los fragmentos de unión. Alternativamente, los fragmentos de colágeno de tipo III nativos, purificados, que portan el neo-epítipo que se reconoce por el anticuerpo monoclonal o por el fragmento de unión se podrían utilizar en la superficie sólida. Aún otra alternativa es inmovilizar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión en la superficie sólida y después co-incubar la muestra con un péptido sintético que se unió apropiadamente a una molécula de señal, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante o la biotina.

10

15

La muestra puede ser una muestra de suero, sangre, plasma u otro, por ejemplo, de biopsia de tejido fibrótico.

20

Los ensayos pueden llevarse a cabo como ensayos de tipo sándwich mediante la utilización de una primera pareja de unión inmunológica reactiva específicamente con uno de los dichos neo-epítipos y una segunda pareja de unión inmunológica reactiva con la proteína de referencia a la que el neo-epítipo pertenece. Opcionalmente, dicha segunda pareja de unión inmunológica se dirige a un segundo neo-epítipo de la misma proteína.

25

En ciertos métodos que se prefieren el método comprende además comparar el nivel que se determinó de dicha unión de dichos fragmentos peptídicos con los valores característicos de (a) individuos sanos comparables y/o (b) una condición fibrótica patológica y asociar opcionalmente un nivel más alto del péptido que se midió (normalmente indicado por un mayor nivel de unión) con un grado más grave de dicha condición.

30

El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen los neo-epítipos como se describe anteriormente mediante la inmunización de ratones con péptidos sintéticos procedentes de la secuencia de aminoácidos de las moléculas de colágeno de tipo III (lo que incluye las secuencias de la lista anterior o las secuencias que terminan en las mismas), por la fusión de las células del bazo de los ratones que se seleccionaron a las células de mieloma, y mediante la comprobación los anticuerpos monoclonales para la unión a neo-epítipos en los péptidos sintéticos correspondientes. La especificidad por los neo-epítipos se puede asegurar al exigir la reactividad con un péptido sintético y una falta de reactividad con ya sea una forma C-prolongada del péptido inmunizante (para un neo-epítipo C-terminal) o una forma N-terminal prolongada del péptido inmunizante (para un neo-epítipo N-terminal). Los anticuerpos para los neo-epítipos también pueden evaluarse para establecer una falta de capacidad de unión al colágeno nativo tipo III. Alternativamente, la especificidad por un neo-epítipo se puede asegurar al exigir que la reactividad del anticuerpo sea negativamente dependiente en la presencia de biotina o de otros grupos funcionales que se unen covalentemente a uno de los aminoácidos terminales.

35

40

La invención puede utilizar una pareja de unión inmunológica que sea específicamente inmunorreactiva con un neo-epítipo que se forma por el clivaje del colágeno tipo III por una proteasa en un sitio terminal en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo III expuesto anteriormente, y puede ser por ejemplo un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo.

45

La invención puede utilizar una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal contra un neo-epítipo C-terminal o N-terminal que se forma por el clivaje del colágeno tipo III en los sitios terminales de las secuencias en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo III expuestas anteriormente.

50

La invención puede utilizar un péptido que comprende un neo-epítipo C-terminal o N-terminal que se forma por el clivaje del colágeno de tipo III en cualquiera de las secuencias parciales de estas proteínas expuestas anteriormente. Tal péptido puede conjugarse como un hapteno a un portador para producir una respuesta inmune a dicho péptido, o inmovilizarse a una superficie sólida o conjugarse con un marcador detectable para su uso en un inmunoensayo.

55

La invención además puede utilizar una molécula de ácido nucleico que se aísle que codifique para un péptido que comprenda un neo-epítipo C-terminal o N-terminal que se forma por el clivaje del colágeno tipo III en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo III expuestas anteriormente.

La invención además puede utilizar un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una señal de expresión y una secuencia codificante que codifica para la expresión de un péptido que comprende un neo-epítipo C-

terminal o N-terminal que se forma por el clivaje del colágeno tipo III en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo III expuestas anteriormente y además puede utilizar una célula huésped que se transforme con un vector tal y expresar dicho péptido.

5 La invención se puede utilizar para estuches, que pueden utilizarse convenientemente para llevar a cabo los métodos que se describen anteriormente. Tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con el péptido sintético; (2) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión de anticuerpo de la invención reactivo con dicho péptido sintético; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con fragmentos de colágeno tipo III nativos purificados; (2) un anticuerpo monoclonal que
10 reconoce un neo-epítipo en los fragmentos del colágeno tipo III y que sea reactivo con dichos fragmentos del colágeno de tipo III purificados; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético que se une a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo en los fragmentos del colágeno tipo III y que sea reactivo con dicho péptido sintético; y (4) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Aún otra alternativa podría ser estuches que incluyen (1) una
15 placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético que se une a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo en los fragmentos del colágeno de tipo III (y que sea reactivo con dicho péptido sintético) y conjugado con peroxidasa de rábano picante.

20 Así, la invención puede utilizar un estuche de inmunoensayo que comprende una pareja de unión inmunológica como se describe en la presente invención, y un agente de competencia que se une a dicha pareja de unión inmunológica, y opcionalmente uno o más de un reactivo de lavado, un tampón, un reactivo de parada, un marcador enzimático, un sustrato marcador enzimático, estándares de calibración, un anticuerpo anti-ratón y las instrucciones.

25 Los ensayos que se describen en la presente invención son útiles en el diagnóstico de la fibrosis en pacientes. Adicionalmente, los ensayos son útiles para la evaluación de la progresión de la enfermedad, y la supervisión de la respuesta a la terapia. Las parejas de unión inmunológica de la invención pueden además utilizarse en la inmunotinción para mostrar la presencia o localización de los productos del clivaje del colágeno de tipo III.

30 La invención se describirá e ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos y a las figuras adjuntas, en los que:

35 La Figura 1 muestra un gráfico que muestra los resultados del ELISA de C03 de diferentes muestras biológicas: Muestras de sueros humanos mezclados (Suero); Líquido amniótico humano (AF); Medios de cultivo de fibroblastos humanos (Fibr. Cltr.);

La Figura 2a muestra un gráfico que muestra los niveles séricos del C03 en ratas con operación(es) simulada(s) y con el conducto biliar ligado al inicio del estudio (b) y en la terminación (t);

40 La Figura 2b muestra los valores delta correspondientes del C03 en suero de rata: Niveles de terminación - Niveles de los valores iniciales;

45 La Figura 3 muestra un gráfico que muestra los niveles del C03 en diferentes muestras de suero humano. Suero normal: a partir de individuos sanos. COPD: Enfermedad Pulmonar Obstruida Crónica (que conduce a la fibrosis pulmonar). Esclerodermia (que conduce a la fibrosis de la piel y pulmonar). HCV: Virus de la Hepatitis C (que conduce a la fibrosis hepática);

La Figura 4 muestra los pesos del Hígado y las puntuaciones del Hígado que se determinan en el Ejemplo 5;

50 La Figura 5 muestra los niveles de los fragmentos del clivaje con MMP-9 del colágeno Tipo III que se midieron de acuerdo con la invención en el Ejemplo 5;

La Figura 6 muestra los niveles de expresión génica del colágeno Tipo III en BDL o ratas con operación simulada que se determinan en el Ejemplo 5;

55 La Figura 7 muestra los cambios de los niveles de expresión del fragmento del clivaje con MMP-9 del colágeno Tipo III reactivo con el anticuerpo que se utilizó en el Ejemplo 5 como se determina por Western blot;

La Figura 8 muestra los resultados de la tinción histológica de las secciones del hígado que se obtienen en el Ejemplo 5;

La Figura 9 muestra las correlaciones entre las mediciones de los fragmentos del colágeno Tipo III de acuerdo con la invención con otros biomarcadores del hígado como se determinan en el Ejemplo 5;

5 La Figura 10 muestra los resultados que se obtienen en las muestras de suero humano en el Ejemplo 6; y

La Figura 11 muestra los resultados que se obtienen en la prueba de la reactividad de un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo N-terminal de la CRP.

10 La Figura 12 muestra la acumulación de colágeno en el hígado de rata que se mide en el Ejemplo 8.

La Figura 13 muestra los resultados del inmunoensayo que se obtienen en el Ejemplo 8.

15 La Figura 14 muestra la correlación de los resultados del inmunoensayo de la Figura 13 con el contenido de colágeno hepático.

La Figura 15 muestra una comparación de los resultados de un inmunoensayo de acuerdo con la invención con las mediciones de ácido hialurónico y de la tinción con rojo Sirio en el Ejemplo 8.

20 La Figura 16 muestra en el primer panel la correlación de los resultados del inmunoensayo de acuerdo con la invención con la tinción con rojo Sirio y en el segundo panel de la correlación entre los niveles de ácido hialurónico y la tinción con rojo Sirio.

25 La Figura 17 muestra la falta de correlación entre los resultados del inmunoensayo de la invención y los niveles de ácido hialurónico.

La Figura 18 muestra las secciones de piel y las mediciones del grosor de la piel que se describen en el Ejemplo 9.

30 La Figura 19 muestra los resultados de un inmunoensayo de acuerdo con la invención en el Ejemplo 9.

La Figura 20 muestra en el panel A imágenes de Western Blot que se obtuvieron en el Ejemplo 9 y en el panel B los resultados del inmunoensayo correspondientes de acuerdo con la invención.

35 La Figura 21 muestra una correlación entre los resultados del inmunoensayo y las mediciones del grosor de la piel.

La Figura 22 muestra una correlación entre los resultados del inmunoensayo de orina y las mediciones de Western blot que se describen en el Ejemplo 9.

40 Ejemplo 1: Colágeno tipo III degradado con MMP-9

Método

45 Clivaje: El colágeno tipo III que se aisló de placenta humana se disolvió en 10 mM de ácido acético (1 mg/ml). La disolución de proteína se pasó después a través de un filtro (Microcon Ultracel YM-10) para eliminar las contaminaciones de los fragmentos. La MMP-9 se preactivó con acetato de 4-aminofenilmercúrico (APMA, Sigma) a 37°C durante 3 horas. Después de las activaciones, el colágeno tipo III y la MMP-9 se mezclaron 100:1 y se incubaron con agitación durante 3 días a 37°C.

50 La disolución se analizó por espectrometría de masas/cromatografía líquida (LC/MS) y los fragmentos se identificaron mediante la realización de una búsqueda en el programa Mascot. Las secuencias de péptidos se seleccionaron por la búsqueda de homología, asegurando que no existiera reactividad cruzada con proteínas relacionadas u otras, así como tampoco reactividad cruzada interespecies.

55 Diseño de anticuerpos: Las secuencias de péptidos se sintetizaron y conjugaron con ovoalbúmina (OVA). Los ratones se inmunizaron cada 2-3 semanas, hasta cinco inmunizaciones. Los títulos de anticuerpos se verificaron por péptidos de tamizaje, tanto en la selección como en la de-selección. Cuando se lograron suficientes títulos de anticuerpos, se seleccionaron los ratones positivos para la fusión, se sometieron a eutanasia, y el bazo se desintegró y las células B se extrajeron para la fusión con las células de mieloma. Las selecciones de las células productoras de anticuerpos se realizaron mediante el cultivo y la re-siembra de las células de las quimeras supervivientes en clones de células individuales.

Los clones se seleccionaron mediante los péptidos de selección y de-selección seguido por pruebas de reactividad nativa (fig. 1), debido a que los neoepítomos se generan por las secuencias de péptidos pequeños sintéticos, que pueden no reflejar las proteínas nativas. Un clon de subtipo IgG se seleccionó para la producción de anticuerpos. La purificación de anticuerpos se realiza mediante una columna de proteína-G.

Desarrollo del ensayo: Las concentraciones óptimas de anticuerpos se determinaron mediante análisis de tablero de ajedrez, con diluciones de recubrimiento de anticuerpo y del péptido de tamizaje, en los ELISA de competencia. La determinación diferente para el ensayo de colágeno que se degrada por la MMP-9 (CO3) se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. Límite de Detección, Promedio de variación Inter e Intraensayo del ensayo de CO3.

Límite de Detección	0.5 ng/ml
Variación Interensayo promedio	3.71 %
Variación Intraensayo promedio	5.48 %

Ejemplo 2: CO3 en muestras biológicas relevantes:

Niveles del CO3 en las ratas con el conducto biliar ligado en comparación con las ratas con operación simulada.

Método: Cuarenta ratas hembras Sprague-Dawley (6 meses de edad) se alojaron en las instalaciones de investigación de animales de Nordic Bioscience. Los experimentos se aprobaron por el Comité de Animales de Experimentación del Ministerio de Justicia de Dinamarca, y se realizaron de acuerdo con el Estándar Europeo de Buenas Prácticas Clínicas (2008/561-1450). Las ratas se alojaron en jaulas estándar tipo III-H a 18-22°C con lecho y material de nido (Altromin 1324; Altromin, Lage, Alemania) y agua purificada (sistema Milli-Q; Millipore, Glostrup, Dinamarca) libremente. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones de un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad.

La fibrosis hepática se indujo por BDL común. En resumen: La rata se anestesió, se encontró el conducto biliar, se realizaron dos ligaduras alrededor de la vía biliar seguido de la disección entre las ligaduras, se cerró el abdomen. En ratas con operación simulada, el abdomen se cerró sin la ligadura del conducto biliar.

Las ratas se dividieron en 2 grupos: el Grupo 1 (10 ratas con operación BDL y 10 con operación simulada) se sacrificaron después de 2 semanas, y el Grupo 2 (9 ratas con operación BDL y 10 con operación simulada) se sacrificaron después de 4 semanas. Al finalizar el período de estudio (2 o 4 semanas), después de al menos 14 horas de ayuno, todos los animales supervivientes fueron asfixiados por CO₂ y se sacrificaron por desangrado.

Las muestras de sangre se tomaron del seno retro-orbital de ratas con al menos 14 horas de ayuno bajo anestesia ligera con CO₂/O₂ al inicio y a la terminación. La sangre se colectó y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente para su coagulación, lo que se siguió por una centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. Todo líquido libre de coágulos se transfirió a tubos nuevos y se centrifugó de nuevo a 1500 g durante 10 minutos. El suero se transfirió a continuación a tubos limpios y se almacenó a -80°C. El CO3 se midió en muestras de suero de las ratas diluidas x 5. Los niveles de las ratas BDL y las Sham se compararon mediante la prueba Mann-Whitney de dos colas no paramétrica ($\alpha = 0.05$) de la significación estadística suponiendo una distribución normal.

Los niveles del CO3 aumentaron significativamente en los grupos BDL en comparación con los animales con la operación simulada. Los resultados se muestran en las Figuras 2a y b.

Ejemplo 3:

CO3 en diferentes enfermedades fibróticas (suero humano)

Los niveles del CO3 se midieron en el suero de humanos con tres enfermedades fibróticas diferentes: la enfermedad pulmonar obstruida crónica (COPD), la Esclerodermia, y la hepatitis viral C (VHC). Las muestras de suero se recuperaron de Sera Laboratories International Ltd (SLI Ltd), Reino Unido.

Los niveles del CO3 se incrementaron en las tres enfermedades fibróticas diferentes (Figura 3)

Ejemplo 4:

Desarrollo de anticuerpos - detección del marcador CO3-610C

5 El colágeno tipo III (Abcam, Cambridge, Reino Unido) se degradó in vitro por la MMP-9 activada (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 2 días. Los fragmentos de degradación se secuenciaron por LS-MS/MS y se identificaron mediante la búsqueda en el MASCOT. Una secuencia peptídica específica ⁶¹⁰KNGETGPQ se seleccionó para la producción del anticuerpo. El N-terminal de esta secuencia es el residuo 610 del colágeno humano tipo III. El péptido sintético se conjugó con la ovoalbúmina antes de la inmunización subcutánea de los ratones Balb/C de 4-6 semanas de edad con aproximadamente 200 µl de antígeno emulsificado y 50 µg del CO3-610C (KNGETGPQGGC-OVA). Las inmunizaciones consecutivas se realizaron a intervalos de dos semanas en adyuvante incompleto de Freund hasta que se alcanzaron niveles de titulación de suero estables. Los ratones se sangraron de la segunda inmunización en lo adelante. En cada sangrado, se midió el título del suero y el ratón con el mayor título de anti-suero se seleccionó para la fusión. Después de la cuarta inmunización, este ratón descansó durante un mes y después se le dio una dosis de refuerzo por vía intravenosa con 50 µg del CO3-610C en 100 µl de disolución de cloruro sódico al 0.9 % tres días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

20 Los clones productores de los anticuerpos monoclonales se seleccionaron mediante la utilización de a) un péptido inmunogénico: KNGETGPQGP-GGC-Ovalbúmina (OVA) (807678), b) un péptido de tamizaje KNGETGPQGP-PG-K-Biotina (807,971), c) los péptidos de de-selección KDGETGAAGPPGK-Biotina (118318) que representa una cadena alfa 1 de colágeno tipo II, KDGEAGAQQPPGK-Biotina que representa un producto de la degradación de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I, comprados a la Chinese Peptide Company, Beijing, China. La placa de ELISA recubierta se obtuvo de NUNC (ThermoFisher, Copenhagen, Dinamarca). Los reactivos de conjugación de péptidos y los tampones se produjeron por Pierce (ThermoFisher, Copenhagen, Dinamarca).

30 El tampón que se utilizó para disolver el péptido de recubrimiento se compuso de lo siguiente: Na₂HPO₄ 40 mM, 12 H₂O, KH₂PO₄ 7 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, EDTA 25 mM, 0,1 % de Tween 20, 1 % de BSA, 10 % de sorbitol, pH 7. Para un ensayo con suero, se utilizó un tampón que contenía los siguientes productos químicos: Na₂HPO₄ 8 mM, 12 H₂O, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 13,7 mM, KCl 2,7 mM, 0,1 % de Tween 20, 1 % de BSA, 0,003 % de rojo fenol, pH 7,4. Un tampón diferente que se utilizó para un ensayo de orina contenía Trizma 400 mM, 0,05 % de Tween 20, 0,1 % de BSA, 0,36 % de Bronidox L5, pH 8,0. Para tanto el ensayo de suero como el de orina se utilizó un tampón de lavado compuesto por Trizma 25 mM, NaCl 50 mM, 0,036 % de Bronidox L5, 0,1 % de Tween 20, y tampón de parada de la reacción compuesto por 0,1 % de H₂SO₄. Las placas de ELISA que se utilizaron para el desarrollo del ensayo se recubrieron con Estreptavidina de Roche (Hvidovre, Dinamarca) cat.: 11940279. Todas las placas de ELISA se analizaron con el lector de ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA Estados Unidos).

40 En los experimentos preliminares, optimizamos los reactivos, sus concentraciones y los períodos de incubación mediante la realización de varios análisis de tablero de ajedrez. Una placa de ELISA de 96 pocillos recubierta con estreptavidina se recubrió adicionalmente con 5 ng/ml del péptido sintético biotinilado KNGETGPQGP disuelto en tampón PBS-TBE a 20°C durante 30 minutos en agitación constante a 300 rpm. Después de lavar con tampón de lavado, se añadieron 20 µl de la muestra, seguido por 100 µl de disolución del mAb-NB51-32 CO3-610C anti-humano conjugado con peroxidasa (23 pg/ml en tampón de incubación). La placa se incubó durante 1 hora a 20°C tiempo durante el cual se agitó a 300 rpm. Esto se siguió por un lavado y, finalmente, se dispensaron 100 µl de tetrametilbenzidina (TMB) (Kem-En-Tec cat.4380H) y se incubó la placa durante 15 minutos en la oscuridad y con agitación a 300 rpm. Con el objetivo de poner fin a la reacción, se añadieron 100 µl de disolución de parada y la placa se analizó en el lector de ELISA a 450 nm con 650 nm como referencia.

50 Se realizó una curva estándar por diluciones en serie del NB51-32 CO3-610C-biotinilado para un ensayo de suero, y NB51-134 CO3-610C-biotinilado para un ensayo de orina. Las concentraciones estándares fueron 0, 0,33, 1, 3, 9, 27, 81 y 162 ng/ml.

Designamos los fragmentos que se detectaron mediante la utilización de los inmunoensayos que así se obtuvieron como CO3-610C teniendo en cuenta que el aminoácido K en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos KNGETGPQGP es el aminoácido 610 de la secuencia del colágeno III humano.

Ejemplo 5

Comparación del CO3-610C y otros biomarcadores en la fibrosis hepática que se indujo en ratas

Animales

40 ratas Sprague-Dawley hembras de 6 meses de edad se alojaron en las instalaciones de investigación de animales de Nordic Bioscience, Copenhague, Dinamarca. Los experimentos se aprobaron por el Comité de Animales de Experimentación del Ministerio de Justicia de Dinamarca y se realizaron de acuerdo con el Estándar Europeo de Buenas Prácticas Clínicas (2008/561 a 1.450). Las ratas se alojaron en jaulas de tipo estándar III-H a 18-22°C con lecho y material de nido (Altromin 1324; Altromin, Lage, Alemania) y agua libremente. Las ratas se mantuvieron en condiciones de un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad.

Diseño del estudio

En 20 ratas, la fibrosis hepática se indujo mediante BDL común. El procedimiento quirúrgico se realizó en condiciones estériles. La rata se anestesió, el conducto biliar se localizó y se ligó en dos lugares seguido por la disección entre las ligaduras, y se cerró el abdomen. Las otras 20 ratas se sometieron a una operación simulada, en la que el abdomen se cerró sin la ligadura del conducto biliar. Las ratas se dividieron en 2 grupos: el Grupo 1 (10 ratas BDL y 10 ratas con operación simulada) se sacrificó después de 2 semanas y el Grupo 2 (10 BDL y 10 ratas con operación simulada) se sacrificó después de 4 semanas. Al finalizar el período de estudio (2 o 4 semanas), después de al menos 14 horas de ayuno, todos los animales supervivientes fueron asfixiados por CO₂ y se sacrificaron por desangrado.

Muestreo de sangre

Las muestras de sangre se tomaron del seno retro-orbital de las ratas después de al menos 14 horas de ayuno, bajo anestesia ligera con CO₂/O₂, al inicio y a la terminación. La sangre se dejó 30 minutos a temperatura ambiente para su coagulación, lo que se siguió por una centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. Todo el líquido libre de coágulos se transfirió a tubos frescos y se centrifugó de nuevo a 1500 g durante 10 minutos. El suero se transfirió después a tubos limpios y se almacenó a -80°C.

Manipulación de los tejidos

Después de que las ratas se sacrificaron, sus hígados se diseccionaron cuidadosamente, se pesaron, se fijaron en formaldehído al 4 % durante un mínimo de 24 horas, se cortaron en rebanadas apropiadas y se embebieron en parafina. Secciones de 5 µm de grosor se cortaron, se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Rojo Sirio. Las secciones del hígado se evaluaron histológicamente por la evaluación de la arquitectura, la presencia de inflamación, la proliferación de los conductos biliares y de la fibrosis. La formación de novo del conducto de la bilis en el parénquima se evaluó semi-cuantitativamente mediante la utilización del siguiente sistema de puntuación: normal = 0, cambios leves (1/3 o menos del lóbulo afectado) = 1, cambios moderados (entre 1/3 y 2/3 del lóbulo afectado) = 2, y cambios severos (2/3 o más del lóbulo afectado) = 3. Las fotografías digitales se capturaron mediante la utilización de un microscopio Olympus BX60 con x 40 y x 100 de aumento y una cámara digital con zoom 5050 Olympus (Olympus, Tokio, Japón).

Determinación del colágeno total y del CTX-II del suero

La concentración total de colágeno se ensayó mediante la utilización del estuche comercial QuickZyme Collagen Assay (QuickZyme Bioscience, Leiden, Países Bajos). La concentración de CTX-II se ensayó mediante la utilización del estuche comercial Rat CTX-II. Todas las muestras se comprobaron por duplicado.

Cuantificación del ARNm del colágeno tipo III

El número de transcritos del colágeno tipo III (Col3a1) en muestras de tejido del hígado se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) mediante la utilización de sondas reporteras fluorescentes. El número de copias Col3a1 en la muestra se extrapola a partir de una curva patrón que se obtuvo mediante la utilización del ADNc plasmídico de Col3a1 Image Clone 7.097.081 (Geneservice, Cambridge, Reino Unido) como estándar de dilución. Las cantidades de Col3a1 se normalizaron con los genes domésticos hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1). Los iniciadores y sondas para los ARNm de Col3a1 y HPRT1 se diseñaron mediante la utilización de las Secuencias de Referencia del NCBI NM_032085.1 y NM_012583.2 como moldes, respectivamente (TIB Molbiol GmbH, Berlín, Alemania). El ARN total se extrajo de muestras congeladas de hígado mediante la utilización del estuche Absolutely RNA Miniprep (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) mediante el seguimiento de las instrucciones del fabricante y su calidad se evaluó en Nano chips de ARN mediante la utilización de un instrumento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa

Clara, CA, Estados Unidos). Inmediatamente después del aislamiento del ARN, el ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el estuche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Basilea, Suiza) mediante la utilización de 1 µg de ARN como molde. Para cada muestra que se ensayó, se incluyó un control negativo de síntesis de ADNc, omitiendo la enzima transcriptasa inversa de la mezcla de reacción. Las reacciones de PCR separadas para Col3a1 y HPRT1 se realizaron en un formato de 20 µl mediante la utilización del estuche LightCycler Faststart DNA Master Plus HybProbe (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los datos de fluorescencia en tiempo real se recogieron en un instrumento LightCycler 2.0 (Roche).

Extracciones

El tejido se pulverizó en un mortero de acero en exceso de nitrógeno líquido. Las muestras se transfirieron después a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se dejaron en agitación durante la noche a 4°C en disolución de ácido acético 0.5 M que contiene un cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Las muestras se sometieron a sonicación con ultrasonido mediante la utilización de 5 pulsos al 60 % de la amplitud (U50 control, IKA Labortechnik) y se dejaron durante un período adicional de 2 horas a 4 °C después de lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con cuidado, y se transfirió a un eppendorf nuevo y se almacenó a -80 °C.

Densitometría

Las mediciones de densitometría se realizaron con un UN-SCAN-IT Versión 6.1 de Silk Scientific (proporcionar ciudad, país).

Análisis de imágenes de histología

Las secciones histológicas que se tiñeron con Rojo Sirio se analizaron mediante la utilización del software Visiopharm versión 3.2.8.0 (proporcionar ciudad, país). Las imágenes se adquirieron mediante una cámara digital de microscopio PixelinkPL-A623C.

SDS PAGE y Western blots

20 g de extracto de tejido se mezclaron con el tampón de carga (Invitrogen LDS 4x, NP0007) que contiene el agente reductor (NuPAGE, NP0004 de Invitrogen). Las muestras se cargaron después en un gel de gradiente de 4-12 % de Bis-Tris (NP0332BOX de Invitrogen) y la electroforesis se desarrolló a 200V durante 52 minutos. Las proteínas se transfirieron después a una membrana de nitrocelulosa mediante la utilización del sistema de transferencia i-Blot (Invitrogen), que se bloqueó después con leche al 5 % en (? Necesidad de explicar?) TTBS durante la noche a 4 grados. El anticuerpo anti Beta Actina (AbCam ab8229, proporcionar empresa, país ciudad?) se utilizó como control de carga.

Análisis estadístico

Los valores medios y el error estándar de la media (SEM) se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, Estados Unidos) y se compararon mediante la prueba t de Student pareado de dos colas ($\alpha = 0.05$) de significación estadística asumiendo una distribución normal, o mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas ($\alpha = 0.05$). El coeficiente de correlación (R^2) y el correspondiente valor p se determinó por una regresión lineal.

Resultados

Apariencia del hígado: En el momento del sacrificio, los hígados de los animales de control mostraron una morfología macroscópica normal, mientras que los hígados de los animales BDL eran agrandados. Los pesos de los hígados fueron significativamente superiores en las ratas BDL en comparación con los controles con operación simulada (pesos medios en el sacrificio: 2 semanas después de la cirugía, simulada 8.1 g; BDL 14.1 g; 4 semanas después de la cirugía, simulada 9.0 g; BDL 19.4 g) (Figura 4 panel A). La puntuación semicuantitativa de las secciones del hígado mediante la utilización de la escala de 0-3 mostró significativamente más cambios estructurales del hígado a las 4 semanas en comparación con a las 2 semanas (Figura 4 Panel B). La Figura 4, panel A muestra el peso del hígado en las ratas con ligadura del conducto biliar (BDL) - o en las ratas con operación simulada. Los datos se muestran como media + SEM.[***, $P < 0.0001$. El panel B muestra la puntuación de los cambios estructurales en el hígado de cada grupo. Los datos se muestran como media + SEM. **, $P = 0.0094$. El panel C muestra las microfotografías con Rojo Sirio que muestran la estructura hepática en ratas con operación simulada, y en ratas BDL a las 2 y 4 semanas después de la cirugía. La estructura hepática en todo el tracto

portal se desorganiza claramente en las ratas BDL en comparación con las ratas con operación simulada. Los colágenos se resaltan en rojo. El aumento original fue x40.

Bajo el examen histológico, el hígado de los animales con operación simulada no mostró signos de fibrosis y era microscópicamente normal (Figura 4C). En los hígados BDL, se observó una proliferación ductal marcada. En el grupo de 2 semanas de post-cirugía, la proliferación se localizó alrededor del tracto portal mientras que en el grupo de 4 semanas la proliferación se extendió (Figura 4C). La deposición de colágeno se encontró alrededor de las estructuras ductulares. La inflamación fue mínima y se limitó a los tractos portales. No se observaron signos de colestasis, ya sea colestasis intracelular, taponos biliares, infartos biliares o formación de rosetas hepatocíticas.

Cambios en los niveles del CO3-610C: La Figura 5 muestra en el panel A los niveles en suero de la degradación del CO3 mediada por MMP-9 en las ratas con ligadura del conducto biliar (BDL) - o en las ratas con operación simulada. Los datos se muestran como la media + el error estándar de la media. 2 semanas post-cirugía *** $P < 0.0001$ y 4 semanas post cirugía ** $P = 0.0014$. En el panel B se muestran los valores delta del CO3-610C (terminación-inicio apareados), 2 semanas post-cirugía $P < 0.0001$ y 4 semanas post-cirugía $P = 0.0016$. En el panel C se muestran los niveles de CTX-II en las ratas BDL- o en las ratas con operación simulada. Los datos se muestran como la media + el error estándar de la media.

En los grupos BDL los niveles de CO3-610C aumentaron considerablemente con respecto a los grupos con operación simulada (valores medios: 2 semanas, post-cirugía simulada 39.7 ng/ml, BDL 100.3 ng/ml; el aumento promedio entre los grupos fue de 153 %; 4 semanas post-cirugía, operación simulada 39.7, BDL 92.6 ng/ml, el aumento promedio entre los grupos fue de 133 %) (Figura 5 paneles A y B). No hubo cambios en los grupos con operación simulada. Los niveles de CTX-II que indican la degradación del colágeno tipo II no cambiaron en los grupos de operación simulada o en los grupos BDL (Figura 5 Panel C).

Expresión de los Genes del Colágeno Tipo III: La Figura 6 muestra la expresión génica del colágeno tipo III en ratas BDL o con operación simulada. Los datos se muestran como media + estándar de la media; 2 semanas post-cirugía $P < 0.0001$ y 4 semanas post-cirugía $P = 0.0006$

El mRNA de la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo III aumentó significativamente en ambos grupos BDL en comparación con las ratas con operación simulada.

Western Blot y Densitometría: La Figura 7 muestra los cambios en la expresión de CO3-610C en el hígado de ratas en los grupos BDL y con operación simulada que se evaluaron por A) Western blot 2 y 4 semanas post-cirugía y B) Bandas de western que se cuantificaron por densitometría.

El análisis por Western Blot mostró niveles muy bajos de CO3-610C en las ratas con operación simulada (Figura 7 Panel A). Durante y después de 2 semanas los niveles de CO3-610C post-cirugía aumentaron prominentemente (Figura 7 Panel A). Los resultados se cuantificaron mediante el análisis de densitometría (Figura 7 panel B).

Análisis de las imágenes de histología: La Figura 8 Panel A muestra en la fila superior las secciones de histología de las ratas BDL o de las ratas con operación simulada teñidas con Rojo Sirio. La fila inferior muestra las secciones histológicas enmascaradas para la cuantificación del contenido total de colágeno (color rojo) en el hígado. El panel B muestra el colágeno total que se cuantificó por el programa Visiopharm - 2 semanas post-cirugía $P = 0.0081$; 4 semanas post-cirugía $P = 0.0047$

Las secciones histológicas que se tiñeron con Rojo Sirio y que se mejoraron mediante la utilización del programa Visiopharm mostraron un aumento del contenido de colágeno en el tiempo en las ratas operadas-BDL. (Figura 8 panel A). El color rojo en la máscara que representa el colágeno se cuantificó mediante la utilización del mismo programa (Figura 8 panel B) y confirmó un aumento significativo en el contenido total de colágeno en las ratas operadas-BDL en comparación con las ratas con operación simulada (2 semanas post-cirugía $P = 0.0081$; 4 semanas post-cirugía $P = 0.0047$).

Correlación: La Figura 9 Panel A muestra que una correlación de Col3a1 con respecto a CO3-610C se encontró con $R^2 = 0.6993$, $P < 0.0001$. En el panel B, una correlación del CO3-610C con respecto al % del colágeno se encontró con $R^2 = 0.2278$ y $P = 0.0050$. En el panel C se encontró una correlación del Co13a1 con respecto al % de colágeno con $R^2 = 0.5409$, $P < 0.0001$.

Se encontraron correlaciones de los siguientes: mRNA de Col3a1 con respecto al CO3-610C con $R^2 = 0.6993$ y $P < 0.0001$ (Figura 9A), y del CO3-610C con respecto al % de colágeno que se cuantificó mediante el visiofarm con $R^2 = 0.2278$ y

P=0.0050 (Figura 9B), y del mRNA de Col3a1 con respecto al % de colágeno que se cuantificó mediante el visiofarm con $R^2=0.5409$ y $P<0.0001$ (Figura 9C).

5 La remodelación de la ECM es un proceso integrado de desarrollo de los tejidos, de mantenimiento y de patogénesis. La actividad proteolítica es esencial en este proceso para la migración celular, la eliminación del tejido dañado, y el secuestro de nuevas proteínas, para la orientación correcta y óptima del tejido y la calidad (108: 109). Los productos específicos de la degradación de la matriz, los neo-epítomos, pueden ser importantes para la identificación de nuevos marcadores bioquímicos del recambio de la matriz de la fibrosis hepática y la comprensión de la patogénesis de la fibrosis. En la actualidad no hay técnicas de medición disponibles, ni marcadores bioquímicos, que permitan la evaluación de la remodelación de la ECM en la patogénesis de la fibrosis.

15 En este ejemplo, para investigar el marcador CO3 - 610C en situaciones in vivo, se eligieron ratas BDL de 6 meses, ya que previamente demostraron tener una remodelación de colágeno más baja en comparación con las ratas más jóvenes. Las ratas son maduras esqueléticamente, y el cartílago de crecimiento es casi inactivo, contribuyendo así en un grado mucho menor a la remodelación global del colágeno. Esto influye en la sensibilidad y la especificidad por el biomarcador. Estas ratas claramente presentadas con fibrosis hepática, tal como se evaluó tanto por análisis histológico cuantitativo, como por el alargamiento con un aumento de peso, por tanto, el modelo fue uno apropiado para buscar evidencia de la remodelación de la ECM, en particular para evidencias de colágeno de tipo III en el suero.

20 Los datos actuales demuestran claramente que el neo-epítomo CO3 - 610C que se obtiene de la degradación del colágeno tipo III por la MMP-9 es un marcador bioquímico de diagnóstico para la fibrosis hepática con un incremento promedio en el suero de hasta el 153 % de las ratas con operación simulada respecto a las ratas operadas-BDL.

25 Para investigar más aun la razón biológica para el aumento del marcador CO3 - 610C, hicimos las extracciones de proteínas a partir de hígados sanos y enfermos. Por Western Blot, identificamos una banda predominante, lo que sugiere que se trata de un fragmento de proteína abundante en los hígados enfermos pero no en los sanos. Esto proporciona evidencia de la exactitud patológica de este marcador novedoso.

30 Para investigar más aun la representación del recambio patológico del hígado, se midió el mRNA del colágeno tipo III. Se encontró un aumento de mRNA en las ratas BDL en comparación con aquellas que se sometieron a la operación simulada, lo que se correlaciona con los resultados anteriores. Estos datos sugieren fuertemente que la fibrosis hepática no es sólo una acumulación de proteínas de la ECM, sino además una situación de recambio acelerado, en la que tanto la formación del tejido como la degradación del tejido son ambas altamente reguladas positivamente. La formación de tejido supera la degradación del tejido, lo que lleva a una acumulación de tejido cicatricial en el tiempo. Investigadores anteriores utilizaron otras proteínas del recambio de la matriz para evaluar la fibrosis hepática, una de ellas es el marcador de formación del colágeno tipo III N-terminal pro-colágeno III. Este marcador representa la formación de colágeno tipo III y demostró que se aumenta en la fibrosis hepática en estudios anteriores.

40 Para comprender más aun la dinámica de los marcadores bioquímicos CO3 - 610C, hicimos una variedad de correlaciones. Lo más importante, había una correlación significativa del CO3 - 610C con el grado de la fibrosis que se midió en el hígado por la histología cuantitativa. El nivel de la fibrosis hepática se correlacionó con los niveles de expresión del mRNA del colágeno tipo III. Finalmente, el CO3 - 610C se correlaciona con el ARNm del colágeno tipo III en el hígado. En su conjunto, hubo una correlación significativa de los procesos patológicos en el hígado con los niveles de los marcadores bioquímicos sistémicos CO3 - 610C. Además las extracciones de tejidos proveyeron pruebas de que los niveles de circulación se produjeron localmente.

Ejemplo 6: ELISA con muestras de suero humanas

50 Las muestras de suero humano se obtuvieron de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) (n = 5), con esclerodermia (n = 5), con infección crónica por virus de la hepatitis C (n = 5), y de controles sanos (n = 5). Las muestras de suero se ensayaron en el ELISA de CO3-610 (véase el Ejemplo 4 anteriormente) para determinar la concentración de los fragmentos del CO3-610. Los resultados se muestran en la Figura 10. Mientras que las muestras de suero de los sujetos sanos tuvieron una concentración de fragmentos de CO3-610 por debajo de 30 ng/ml, se encontró que los sujetos enfermos tenían niveles elevados en circulación lo que sugiere una remodelación masiva del tejido en los tejidos fibróticos afectados.

Ejemplo 7: Reactividad del clon nb94

Los ratones se inmunizaron con el péptido sintético KAFVFP (SEQ ID NO1167) que se conjugó con ovoalbúmina (KAFVFPKESD-GGC-OVA (SEQ ID NO1049)), se utilizaron células de bazo para la fusión, y los anticuerpos monoclonales se comprobaron para determinar la reactividad con el KAFVFP biotinilado (SEQ ID NO 1167), es decir, (KAFVFPKESD-biotina (SEQ ID NO1049)) se inmovilizó en pocillos de placas de microtitulación recubiertas previamente con estreptavidina. Los anticuerpos que se unen al KAFVFPKESD biotinilado (SEQ ID NO1049), que podrían ser inhibidos mediante la co-incubación con el KAFVFPKESD (SEQ ID NO1049) pero no con el péptido alargado RKAFVFPKESD (SEQ ID N01166), se seleccionaron para una caracterización adicional. El anticuerpo monoclonal que se prefirió se designó NB94-37-1A7.

La utilización de un ELISA de competencia, se realizó esencialmente como se describe anteriormente con el KAFVFPKESD biotinilado (SEQ ID NO1049) (utilizado a 0.15 ng/ml) inmovilizado en los pocillos de las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina, una etapa de incubación (90 minutos a 20°C) con la muestra y el anticuerpo monoclonal NB94-37-1A7 seguido por una etapa de lavado, y después la adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugados con peroxidasa. Para la competencia se utilizó el siguiente material en diluciones dobles;

(1) el péptido sintético KAFVFP (SEQ ID N01167); (2) un péptido sin sentido (KNEG TG) no relacionado con la CRP; (3) una mezcla de muestras de suero humano; (4) la CRP que se escindió proteolíticamente con MMP3 durante 7 días, se detuvo posteriormente mediante la adición de EDTA para bloquear la actividad de la proteasa, y se almacenó a -80°C hasta las pruebas; (5) igual que (4), pero con la utilización de la MMP8 en lugar de la MMP3; (6) igual que (4) excepto por el uso de la catepsina K (durante 2 días) en lugar de la MMP3 (y E64 como inhibidor para bloquear la actividad de la catepsina K).

Los datos demuestran que el anticuerpo monoclonal NB94-37-1A7 se une fuertemente al péptido sintético KAFVFPKESD (SEQ ID N01049), y con la CPR que se clivó con la MMP3 y la MMP8. El clivaje de la CRP con la catepsina K libera menos analito que se reconoce por el anticuerpo monoclonal NB94-37-1A7. Finalmente, los datos muestran que el anticuerpo se une a los fragmentos peptídicos en el suero humano lo que confirman la presencia de esta secuencia en los fragmentos peptídicos que circulan.

Ejemplo 8: CO3 en muestras biológicas relevantes: niveles de CO3 en la cirrosis que se induce por Tetracloruro de carbono (CCl4) en ratas.

Animales e inducción de la cirrosis:

Este estudio incluyó a 52 ratas Wistar machos con fibrosis o cirrosis y 35 ratas macho Wistar de control. Para hacer que desarrollen fibrosis o cirrosis animales de tres meses de edad se incluyeron en un programa de inducción con tratamientos con tetracloruro de carbono (CCl4) y con fenobarbital. El CCl4 se administró por inhalación dos veces por semana y el fenobarbital (0.3 g/l) se añadió al agua de beber. A los animales se les permitió el libre acceso al agua y los alimentos durante todo el estudio.

Cuantificación de la fibrosis:

Las secciones del hígado (4 µM) se tiñeron en 0.1 % de rojo Sirio F3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en ácido pícrico saturado (Sigma-Aldrich). El área de fibrosis relativa (que se expresó como un porcentaje del área total del hígado) se evaluó mediante el análisis de 36 campos de las secciones de hígado que se tiñeron con rojo Sirio por animal. Cada campo se adquirió con un aumento de 10X [microscopio E600 (Nikon) y cámara digital RT-Slider SPOT (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI)]. Los resultados se analizaron mediante la utilización de un sistema de morfometría Bioquant Life Science computarizado. Para evaluar el área de fibrosis relativa, el área de colágeno que se midió se dividió por el área de campo neta y luego se multiplicó por 100. La resta del área luminal vascular de la superficie total del campo produjo el cálculo final de la superficie neta de la fibrosis. De cada animal que se analizó, se midió la cantidad de fibrosis en porcentaje y el valor promedio que presentó.

Clasificación de los grupos de acuerdo con su estadio de fibrosis/cirrosis:

Los animales se clasificaron en 4 estadios diferentes de la fibrosis y la cirrosis (Grupo A: fibrosis moderada, grupo B: fibrosis avanzada, Grupo C: cirrosis moderada, y Grupo D: cirrosis avanzada) que se determinaron por el porcentaje de área del hígado positiva a rojo Sirio (Grupo A: <5 %, Grupo B: de 5 a 10 %, Grupo C: de 10 a 15 % y Grupo D: >15 %). Con este propósito, las ratas de control y fibróticas/cirróticas se estudiaron considerando cuatro puntos temporales diferentes durante el tratamiento con CCl4: 8, 12, 16 y 20 semanas después de iniciar el programa de inducción de la cirrosis.

Medición de ácido hialurónico:

El hialuronano en suero se midió mediante la utilización de un estuche de ELISA sándwich &D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

Estadísticas:

5

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante pruebas t de Student no pareadas cuando se consideró adecuado. Los datos se expresaron como media \pm S.E.M, y se consideraron significativos a nivel de p de 0.05 o menos.

Diseño del estudio:

10

Los animales que se incluyeron en este protocolo se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: A / ocho semanas de tratamiento con CCL₄, B/ doce semanas de tratamiento con CCl₄, C/ dieciséis semanas de tratamiento con CCl₄ y D/ veinte semanas de tratamiento con CCl₄. En paralelo, se estudiaron cuatro grupos de control en los mismos puntos temporales. Trece ratas fibróticas y siete ratas de control se incluyeron en cada grupo. Al final del estudio, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas estándar (Tecniplast Deutschland, Hohenpeissenberg, Alemania) durante un período de adaptación de 3 días antes de proceder a la recolección de orina de veinticuatro horas. Los volúmenes urinarios se determinaron por gravimetría. Durante el periodo de adaptación, a las ratas se les permitió el libre acceso al agua del grifo y a los alimentos. Después, las muestras de orina de 24 horas se centrifugaron durante 5 min a 2,500 rpm y se dispensaron en 10 tubos de polipropileno (400 μ L cada uno). Las muestras de orina se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

20

En las necropsias que se programaron, las ratas se pesaron, se anestesiaron con pentobarbital (50 mg/kg) y se decapitaron. La sangre se recolectó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 min para permitir la coagulación y después se centrifugó durante 10 min a 2500 rpm. El suero se recogió en alícuotas en tubos de polipropileno (400 μ l en cada una) y se transfirió en hielo seco a un congelador de -80°C. La recolección de las muestras de sangre iniciales al comienzo del tratamiento con CCl₄ no se consideró con el fin de evitar una intervención adicional que puede aumentar el riesgo de infección y/o introducir modificaciones en el modelo experimental que puedan comprometer la evolución del proceso fisiopatológico que se indujo. Para la histología y para la tinción con rojo Sirio, la mitad del lóbulo izquierdo del hígado se colocó en formalina tamponada neutra al 10 % durante 16 horas, se embebió en parafina y se cortó en rodajas de 4- μ m de grosor. Después de la cuantificación de la fibrosis hepática, el material de bloque de parafina que no se utilizó se conservó para la cuantificación de los biomarcadores. La otra mitad del lóbulo izquierdo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó para el Western blot, el RT-PCR o el análisis inmunohistoquímico. Las mediciones del área fibrótica del hígado, de la osmolalidad urinaria y del suero, de los iones Na⁺ y K⁺, de la albúmina, la creatinina, de la alanina amino-transferasa y de la lactato dehidrogenasa se realizaron de acuerdo a la sección de Material y Métodos.

25

30

Resultados:

Validación histológica del modelo:

35

El colágeno del hígado se cuantificó en todos los animales del estudio por tinción con rojo Sirio de los cortes del hígado. Los datos finales para cada animal se tomaron como el promedio de tinción con rojo que se observó en 36 campos microscópicos consecutivos (Figura 12).

40

La Figura 12 muestra imágenes representativas de dos conjuntos de 36 imágenes que se utilizaron para cuantificar la acumulación de colágeno en el hígado en la rata # 1 (izquierda) y en la rata # 43 (derecha) que se trataron con tetracloruro de carbono por ocho y veinte semanas respectivamente.

45

El marcador CO3 del suero muestra un aumento estadísticamente significativo en las ratas tanto fibróticas como cirróticas en comparación con las ratas de control. Los animales se clasificaron de acuerdo a una tinción totalmente automatizada con rojo sirio el procedimiento de hígado que se utilizó para cuantificar la fibrosis (Figuras 13 y 14).

50

La Figura 13 muestra los niveles del CO3 en suero en las ratas de control y en las que inhalaban CCl₄ como se realizó en el Hospital Clínic (Barcelona). Cada punto representa un animal. Las ratas se clasificaron según un método de análisis de imagen computarizado de la tinción con rojo sirio del hígado que se utilizó para cuantificar la fibrosis.

55

Cuando se estudiaron los valores cuantitativos del CO3 en suero y la tinción con rojo sirio del hígado en cada animal individual, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre las dos variables ($R^2 = 0.4087$; $n = 21$) (Figura 14).

Comparamos los niveles del CO3-610C con el punto de referencia serológico del ácido hialurónico de la fibrosis hepática (HA). Los niveles del HA se cuantificaron con un estuche de ELISA comercial y los resultados muestran elevaciones significativas de este componente de la ECM en ratas cirróticas vs. animales fibróticos (Figuras 15 y 16).

La correlación del C03 respecto al rojo Sirio superó a la del HA. Más del setenta por ciento de la variación en la cuantificación histológica de la fibrosis hepática se puede explicar por la medición serológica del CO3. El treinta por ciento restante se debe a variables que no se conocen o a la variabilidad inherente. En cambio solamente el 25 % de la fibrosis hepática se puede explicar mediante la medición del ácido hialurónico (Figura 15).

Como era de esperar a partir del resultado anterior no se pudo encontrar una correlación entre el CO3 y el ácido hialurónico lo que sugiere que son el resultado de dos procesos fisiopatológicos independientes en el desarrollo de la fibrosis hepática (Figura 17).

Ejemplo 9: Fibrosis de la piel que se induce por la bleomicina en ratones.

Los ratones se trataron mediante la aplicación en la piel de PBS o bleomicina. El aumento de los niveles en la orina del fragmento C03-610 de la degradación del colágeno III (C03) por la MMP-9 se asocia con la progresión de la fibrosis en la piel en los ratones.

La Figura 18 muestra una sección de piel de un ratón que se trató con PBS a las 8 semanas de tratamiento (panel A) y una sección de piel de un ratón que se trató con Bleomicina a las 8 semanas de tratamiento (panel B). El aumento de grosor de la piel entre los ratones que se trataron con el PBS (n=7/punto temporal) y con la Bleomicina (n=13/punto temporal) durante 2 semanas (P = 0.0029), 4 semanas (P = 0.0004), 6 semanas (P < 0.0001) y 8 semanas (P < 0.0001) se graficó en los paneles C y D. El grosor de la piel en general aumenta al comparar los ratones que se trataron con el PBS (n = 28) y los que se trataron con la bleomicina (n = 52) durante la duración del estudio (P < 0.0001). El ancho de la piel se calculó por el software Visiopharm como un número global por sección de piel en lugar de las imágenes de muestreo.

La Figura 19 muestra los resultados del ensayo del CO3-610 en orina de que demuestran un aumento significativo a través de los puntos temporales del estudio La figura muestra el resultado por punto temporal (ratones que se trataron con PBS n=7, con Bleomicina n=13 por punto de terminación) y los niveles del CO3-610 colectivos para todos los puntos temporales (ratones que se trataron con Bleomicina n = 52 y con PBS n = 28 PBS). 2 semanas P = 0.0008, 4 semanas P < 0.0001, 6 semanas P < 0.0001, 8 semanas P < 0.0001 y en general P < 0.0001.

La Figura 20 muestra una imagen de Western Blot del CO3-610 con el control C y con la Bleomicina B después de 2 y 8 semanas de tratamiento (panel A). Las mediciones de densitometría del CO3-610 para todos los puntos temporales (ratones que se trataron con PBS n=7 y Bleomicina n=13 por punto de terminación) y los niveles del CO3-610 colectivos (ratones que se trataron con PBS n = 28 y ratones que se trataron con bleomicina n=52) se muestran en el panel B, demuestran un aumento estadísticamente significativo de los niveles del CO3-610 (P < 0.0001).

Como se ve en la Figura 21, se encontró que los niveles del CO3-610 en el ensayo de orina se correlacionan con la progresión del grosor de la piel, y por lo tanto con la deposición total de colágeno $r = 0.4883$, $R^2 = 0.2384$.

Como se ve en la Figura 22, se encontró una correlación estadísticamente significativa ($r = 0.6528$, $P < 0.0001$) entre los resultados del ensayo ELISA de orina de CO3-610 y las mediciones de densitometría del Western Blot.

La Aplicación Divisional de Patentes EP14169636.9 describe y reivindica los bioensayos análogos que se relacionan con los fragmentos proteolíticos del Colágeno tipo I, IV, V, y VI, de la elastina, de la proteína C-reactiva, y los proteoglicanos que incluyen el Biglicano, la Decorina, el Versicano, y el Perlecano. En particular, esa aplicación divisional describe los métodos de cuantificación de la fibrosis que se basan en secuencias específicas de estas proteínas para obtener detalles de cuáles referencias podrían tenerse para la lista de secuencias de este caso. Las secuencias que figuran en la lista de secuencias para este caso que no se refieren específicamente a las anteriores se refieren en la Solicitud de Patente Divisional EP14169636.9.

En esta especificación, a menos que expresamente se indique lo contrario, la palabra "o" se utiliza en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando una o ambas de las condiciones indicadas se cumple, en contraposición con el operador "exclusivo o" que requiere que sólo una de las condiciones se cumpla. La palabra "comprende" se utiliza en el sentido de "que incluye" y no en el sentido de "que consiste en". Todas las enseñanzas anteriores que se reconocen

anteriormente se incorporan de este modo por referencia. El no reconocimiento de cualquier documento que se publicó antes en la presente invención debe tomarse como una admisión o una representación de que la enseñanza de la misma era de conocimiento general común en Australia o en cualquier otro lugar en la fecha de la misma.

5 Lista de Referencia

1. World Health Organization. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Reducing Risks, Promoting Healthy Life, Ginebra: WHO, 2002:1-230.
2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214:199-210.
- 10 3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105.
4. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.
- 15 5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-529.
6. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S47-S56.
7. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425.
- 20 8. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-C9.
9. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):307-313.
- 25 10. Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc Res Tech* 1997;38:407-412.
11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-1546.
12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. *Lung Biology in Health and Disease.* 80 ed. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1995.
- 30 13. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:77-84.
14. Gilliam AC. Scleroderma. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:258-279.
15. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76-99.
- 35 16. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-2051.
17. Svensson L, Oldberg A, Heinegard D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:S23-S28.
18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12:19-32.
19. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem* 1987;262:13120-13125.
- 40 20. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 1999;72:210-220.
21. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 1992;267:19536-19547.
- 45 22. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 1994;269:10119-10126.
23. Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 1992;267:20613-20619.
24. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264:4571-4576.
- 50 25. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* 1995;270:7437-7444.
26. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24:153-166.
- 55 27. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444.
28. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 1999;147:909-912.

29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
30. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384.
- 5 31. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007;27:413-426.
32. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184.
- 10 33. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 2006;107:1397-1404.
34. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein AL, Pure E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 2006;37:352-360.
35. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:93-101.
- 15 36. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006;73:490-494.
37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137.
38. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S32-S38.
- 20 39. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998;15:22-37.
40. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007;381:107-113.
41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 2007;11:1031-1051.
- 25 42. Mariat C. [Diagnosis and follow-up of chronic kidney graft dysfunction: from DFG to new biomarkers]. *Nephrol Ther* 2008;4 Suppl 3:S204-S207.
43. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007;42:573-582.
- 30 44. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998;5:187-192.
45. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2006;26:1095-1099.
- 35 46. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:945-951.
47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyaluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.
- 40 48. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (igf-I) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:3245-3250.
- 45 49. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2007;7:17.
- 50 50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyaluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.
51. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:775-782.
52. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, Zarski JP. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006;13:643-651.
- 55 53. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1073-1076.

54. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:843-848.
55. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006;12:3338-3343.
56. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1128-1136.
57. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-942.
58. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:1031-1039.
59. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-992.
60. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosenthal-Allieri MA, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13:659-670.
61. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008;48:765-773.
62. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
63. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16:31-37.
64. Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395-402.
65. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattonet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:547-555.
66. Leroy V, Halfon P, Bacq Y, Boursier J, Rousselet MC, Bourliere M, De MA, Sturm N, Hunault G, Penaranda G, Brechot MC, Trocme C, Cales P. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data. *Clin Biochem* 2008;41:1368-1376.
67. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranet JF, Le BB, de L, V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:6.
68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002;9:128-133.
69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
70. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrec D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de L, V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007;7:40.
71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-1896.
72. Naveau S, Raynard B, Ratziu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:167-174.

73. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
- 5 74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Grimaldi A, Poynard T. Screening for liver fibrosis by using a noninvasive biomarker in patients with diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:828-831.
75. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
- 10 76. Poynard T, Zoulim F, Ratziu V, Degos F, Imbert-Bismut F, Deny P, Landais P, El HA, Slama A, Blin P, Thibault V, Parvaz P, Munteanu M, Trepo C. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1970-1980.
77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
- 15 78. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
79. Carvalho-Filho RJ, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Sampaio JP, Lanzoni VP, Ferraz ML, Silva AE. Optimized cutoffs improve performance of the aspartate aminotransferase to platelet ratio index for predicting significant liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection. *Liver Int* 2008;28:486-493.
- 20 80. Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *HIV Med* 2005;6:375-378.
81. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2008.
- 25 82. Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Vigano M, Del PP, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. *J Hepatol* 2008;49:564-571.
83. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008;397:51-54.
- 30 84. Snyder N, Gajula L, Xiao SY, Grady J, Luxon B, Lau DT, Soloway R, Petersen J. APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:535-542.
85. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2007;381:119-123.
- 35 86. Hongbo L, Xiaohui L, Hong K, Wei W, Yong Z. Assessing routine and serum markers of liver fibrosis in CHB patients using parallel and serial interpretation. *Clin Biochem* 2007;40:562-566.
87. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
- 40 88. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005;51:1867-1873.
89. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297-306.
90. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:582-588.
- 45 91. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H, Forouzanfar MH, Abedian S, Tavangar SM, Mohamadkhani A, Ghoujehi F, Estakhri A, Nouri N, Farzadi Z, Najjari A, Malekzadeh R. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-virus related liver disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2537-2545.
92. Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007;120:280-14.
- 50 93. Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:242-247.
94. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686-693.
- 55 95. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.

96. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
- 5 97. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.
98. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:731-738.
- 10 99. Moller S, Hansen M, Hillingso J, Jensen JE, Henriksen JH. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. *Gut* 1999;44:417-423.
100. Rosen HN, Parker RA, Greenspan SL, Iloputaife ID, Bookman L, Chapin D, Perlmutter I, Kessel B, Qvist P, Rosenblatt M. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. *Calcif Tissue Int* 2004;74:415-423.
- 15 101. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA, Jung K. Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. *Eur Urol* 2007.
102. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, bdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Immunoassay Immunochem* 2007;28:199-211.
- 20 103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1423-1431.
104. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemela O. Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. *Liver Int* 2008;28:787-797.
- 25 105. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994;20:388-393.
106. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, . Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995;75:913-918.
- 30 107. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
108. Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., and Nagase, H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29:10261-10270.
- 35 109. Lijnen, H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost* 86:324-333.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método para el diagnóstico o la cuantificación de la fibrosis que es diferente de un diagnóstico o cuantificación de la aterosclerosis, que comprende, realizar un inmunoensayo en una muestra de biofluido que se obtiene de un paciente para medir los fragmentos de proteína que contienen un neo-epítipo naturalmente presente en dicha muestra, y que asocian una elevación de dicha medición en dicho paciente por encima de un nivel normal con la presencia o el grado de la fibrosis, en donde dicho inmunoensayo se lleva a cabo por un método que comprende:
- 10 poner en contacto los fragmentos de proteínas naturalmente presentes en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica específicamente reactiva con un neo-epítipo N-terminal que se forma por el clivaje de una proteína por una proteinasa o con un neo-epítipo C-terminal que se forma por el clivaje de una proteína por una proteinasa, cuya pareja de unión inmunológica es no reactiva con la proteína intacta de la que deriva el epítipo, y medir el grado de unión de los fragmentos peptídicos a dicha pareja de unión inmunológica para medir en los mismos los fragmentos de proteína que comprenden dicho neo-epítipo, y en donde dicha proteína es el colágeno tipo III.
- 15 **2.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a los fragmentos de colágeno tipo III que tienen una secuencia N-terminal KNGETG...
- 20 **3.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constituido por una secuencia de aminoácidos N-terminal presente en los péptidos que se producen por el clivaje del colágeno tipo III, dichos péptidos comprenden una secuencia N-terminal que se selecciona del grupo que consiste en:

25

30

35

40

45

50

55

ES 2 529 101 T3

	Colágeno tipo III		
	GIPGAP... SEQ ID NO372	GDPGPP... SEQ ID NO373	LAGPPG... SEQ ID NO89
	IAGITG... SEQ ID NO375	IKGHRG... SEQ ID NO376	RGLAGP... SEQ ID NO377
	KGDAGQ... SEQ ID NO381	ITGARG... SEQ ID NO379	VKGESG... SEQ ID NO380
5	GKSGDR... SEQ ID NO383	LQGLPG... SEQ ID NO384	LRGGAG... SEQ ID NO382
	DGTSGH... SEQ ID NO135	IGSPGP... SEQ ID NO	AIGSPG... SEQ ID NO143
	GPPGVA... SEQ ID NO158	AGPPGM... SEQ ID NO145	LSGERG... SEQ ID NO176
10	GARGLA... SEQ ID NO111	GAPGEK... SEQ ID NO141	PQGPPG... SEQ ID NO389
	KGESGK... SEQ ID NO374	GLSGER... SEQ ID NO387	YQGPPG... SEQ ID NO401
	QPGVMG... SEQ ID NO144	IPGAPG... SEQ ID NO117	FRGPAG... SEQ ID NO137
15	GPPGPT... SEQ ID NO391	INGSPG... SEQ ID NO392	GPPGEP... SEQ ID NO393
	GLPGPP... SEQ ID NO394	KNGETG... SEQ ID NO395	LPGIAG... SEQ ID NO396
	GINGSP... SEQ ID NO397	PGENGK... SEQ ID NO398	LKGENG... SEQ ID NO399
20	LMGARG... SEQ ID NO400	GKDGES... SEQ ID NO418	QQGAIG... SEQ ID NO390
	DKGEPG... SEQ ID NO403	GHAGAQ... SEQ ID NO404	GERGAP... SEQ ID NO402
	PGMKGH... SEQ ID NO406	FPGARG... SEQ ID NO407	GFPGAR... SEQ ID NO408
	FPGMKG... SEQ ID NO409	PGDKGE... SEQ ID NO410	GDKGET... SEQ ID NO411
25	GQPQDK... SEQ ID NO412	GPPGEN... SEQ ID NO413	AAGFPG... SEQ ID NO417
	GERGSP... SEQ ID NO415	PGVPGA... SEQ ID NO416	GARGND... SEQ ID NO419
	GSDGQP... SEQ ID NO405	GPPGPP... SEQ ID NO100	GGAGPP... SEQ ID NO425
30	GFPGAP... SEQ ID NO420	GAAGEP... SEQ ID NO421	GARGPP... SEQ ID NO422
	PGPQGH... SEQ ID NO426	PGFPGM... SEQ ID NO427	GSPGGP... SEQ ID NO428
	PGPPGI... SEQ ID NO432	GITGAR... SEQ ID NO430	GIAGIT... SEQ ID NO431
35	GPPGSN... SEQ ID NO423	RPGLPG... SEQ ID NO436	GAPGPM... SEQ ID NO438
	PQQLQG... SEQ ID NO440	GPPGVA... SEQ ID NO158	SGDRGE... SEQ ID NO429
	GAPGFR... SEQ ID NO435	PGFRGP... SEQ ID NO443	GPVGPS... SEQ ID NO447
	GAPGPQ... SEQ ID NO445	GFPGNP... SEQ ID NO446	GPPGIN... SEQ ID NO470
40	GPTGPL... SEQ ID NO448	GDAGQP... SEQ ID NO449	NGEKGE... SEQ ID NO450
	KGSPGA... SEQ ID NO444	GSPGER... SEQ ID NO439	AIGPSG... SEQ ID NO368
	GSRGAP... SEQ ID NO462	TGARGL... SEQ ID NO378	ERGLPG... SEQ ID NO385
45	NTGAPG... SEQ ID NO437	VGGLAG... SEQ ID NO155	VAGPPG... SEQ ID NO452
	HAGAQQ... SEQ ID NO434	PGAPGG... SEQ ID NO455	GIPGFP... SEQ ID NO414
	PGPQGP... SEQ ID NO453	AGQQGA... SEQ ID NO457	PGPPGP... SEQ ID NO458
	AGQPGE... SEQ ID NO454	GLAGPP... SEQ ID NO388	GRNGEK... SEQ ID NO460
50	VKGERG... SEQ ID NO159	GGAGEP... SEQ ID NO463	SPGGKG... SEQ ID NO459
	GPPGAP... SEQ ID NO461	SPGAQG... SEQ ID NO465	PGVSGP... SEQ ID NO466
	GSPGAQ... SEQ ID NO464	IKGPAG... SEQ ID NO169	PGAPGQ... SEQ ID NO456
55	PGAPGL... SEQ ID NO467	GIPGQP... SEQ ID NO468	SRGAPG... SEQ ID NO451
	ESCPTG... SEQ ID NO433	DAGAPG... SEQ ID NO469	GPKGDA... SEQ ID NO424
	GPAGIP... SEQ ID NO441		

ES 2 529 101 T3

4. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constiuido por una secuencia de aminoácidos C-terminal presente en los péptidos que se producen por el clivaje del colágeno tipo III, dichos péptidos comprenden una secuencia C-terminal que se selecciona del grupo que consiste en:

	Colágeno tipo III		
5	...GPPGPA SEQ ID NO94	...NGDPGI SEQ ID NO471	...SPGPQG SEQ ID NO472
	...GMPGPR SEQ ID NO473	...SPGPAG SEQ ID NO474	...PGPQGV SEQ ID NO475
	...ERGAAG SEQ ID NO476	...PGPLGI SEQ ID NO477	...AAGTPG SEQ ID NO478
10	...ERGPPG SEQ ID NO147	...PGPPGT SEQ ID NO479	...GNRGER SEQ ID NO480
	...GLPGLA SEQ ID NO486	...APGLRG SEQ ID NO481	...HPGSPG SEQ ID NO482
	...GLAGTA SEQ ID NO488	...GSPGPA SEQ ID NO484	...GPAGPP SEQ ID NO485
	...LAGPPG SEQ ID NO89	...PGLMGA SEQ ID NO489	...QGPPGP SEQ ID NO487
15	...IPGFPG SEQ ID NO492	...GPPGPQ SEQ ID NO490	...GFPGMK SEQ ID NO493
	...FPGPKG SEQ ID NO491	...GPAGIP SEQ ID NO441	...FPGAPG SEQ ID NO494
	...GPPGIC SEQ ID NO2187	...PPGPPG SEQ ID NO119	...FPGARG SEQ ID NO407
	...PGPQGL SEQ ID NO497	...GAPGLM SEQ ID NO498	...GAIGPS SEQ ID NO495
20	...SPGPKG SEQ ID NO499	...LPGAAG SEQ ID NO2188	...APGPLG SEQ ID NO2189
	...LPGPPG SEQ ID NO72	...GPPGIN SEQ ID NO470	...IPGQPG SEQ ID NO501
	...GHRGFD SEQ ID NO503	...PGLPGI SEQ ID NO504	...GAAGIK SEQ ID NO505
25	...GLPGIA SEQ ID NO507	...PGPKGD SEQ ID NO506	...GPPGVA SEQ ID NO158
	...GLPGPP SEQ ID NO394	...GANGLP SEQ ID NO510	...GPPGPS SEQ ID NO511
	...TGARGL SEQ ID NO378	...GPPGIK SEQ ID NO512	...TAGFPG SEQ ID NO513
30	...PQGLPG SEQ ID NO508	...GAPGLR SEQ ID NO509	...GPQGVK SEQ ID NO524
	...GTPGLQ SEQ ID NO521	...GEVGPA SEQ ID NO514	...GSPGPQ SEQ ID NO533
	...GMKGHR SEQ ID NO531	...GKPGAN SEQ ID NO537	...QPGLPG SEQ ID NO536
	...EMGPAG SEQ ID NO534	...PGAAGF SEQ ID NO539	...PGANGL SEQ ID NO529
35	...GVKGER SEQ ID NO538	...GDAGAP SEQ ID NO542	...GPAGER SEQ ID NO543
	...GPPGPR SEQ ID NO544	...GPAGPR SEQ ID NO545	...RGFDGR SEQ ID NO546
	AGPRGA SEQ ID NO547	...GGKGER SEQ ID NO548	...APGLMG SEQ ID NO549
40	...GRNGDP SEQ ID NO171	...GPAGAN SEQ ID NO550	...PQGVKG SEQ ID NO541
	...AGIPGF SEQ ID NO496	...VKGESG SEQ ID NO380	...TGERGA SEQ ID NO540
	...PPGPQG SEQ ID NO103	...TGPRGP SEQ ID NO177	...GSPGYQ SEQ ID NO526
	...IPGAPG SEQ ID NO117	...EPGPRG SEQ ID NO516	...GAAGAR SEQ ID NO528
45	...TSGHPG SEQ ID NO518	...GAPGPA SEQ ID NO519	...TGAPGS SEQ ID NO502
	...PSGPPG SEQ ID NO483	...GTSGHP SEQ ID NO522	...GTGGPP SEQ ID NO530
	...PPGPAG SEQ ID NO52	...GAPGLK SEQ ID NO525	...GITGAR SEQ ID NO430
50	...FPGMKG SEQ ID NO409	...GEPGPR SEQ ID NO500	...GIAGPR SEQ ID NO535
	...EKGPAG SEQ ID NO515	...PGPKGN SEQ ID NO527	...GLSGER SEQ ID NO387
	...MPGPRG SEQ ID NO523	...PPGAPG SEQ ID NO517	...EGGPPG SEQ ID NO532
55	...GIPGAP SEQ ID NO372	...TPGLQG SEQ ID 520	...GFPGAR SEQ ID NO408

Curva estándar

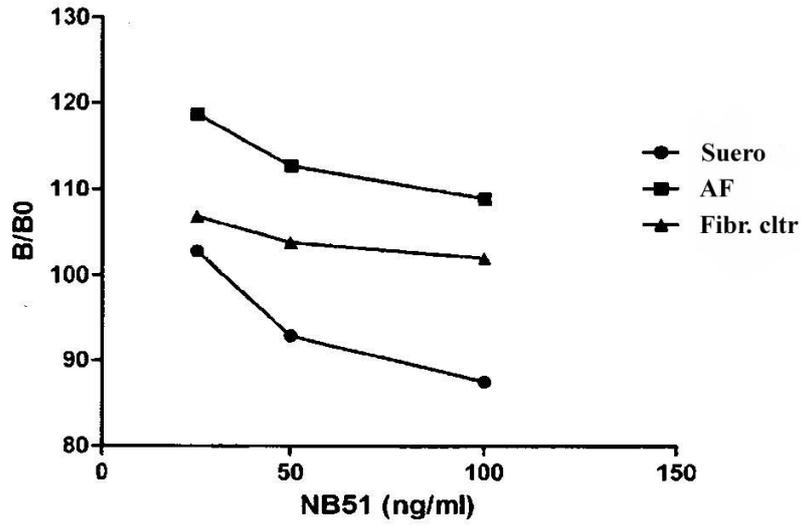


Figura 1

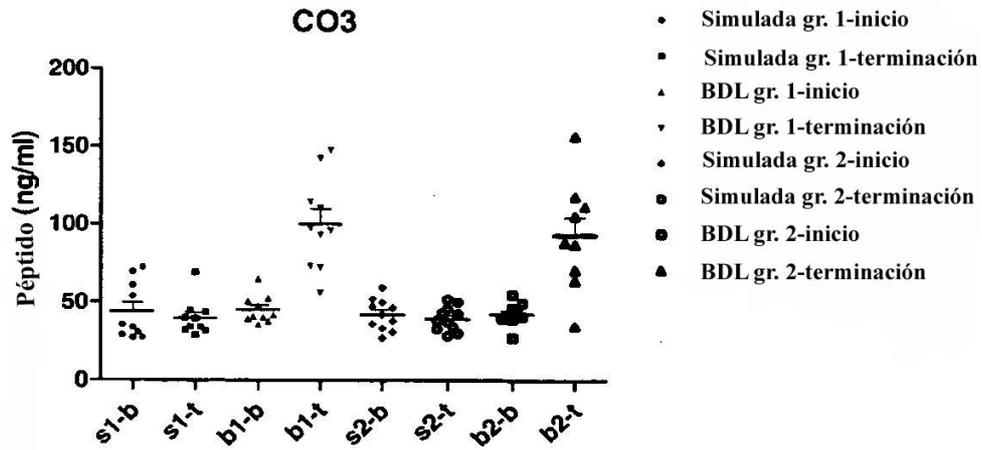


Figura 2A

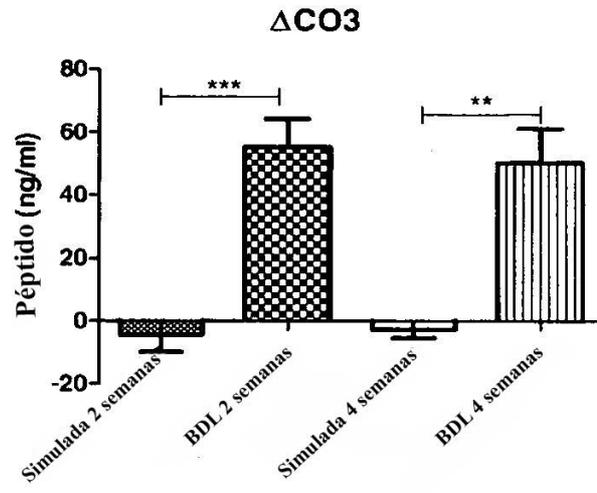


Figura 2B

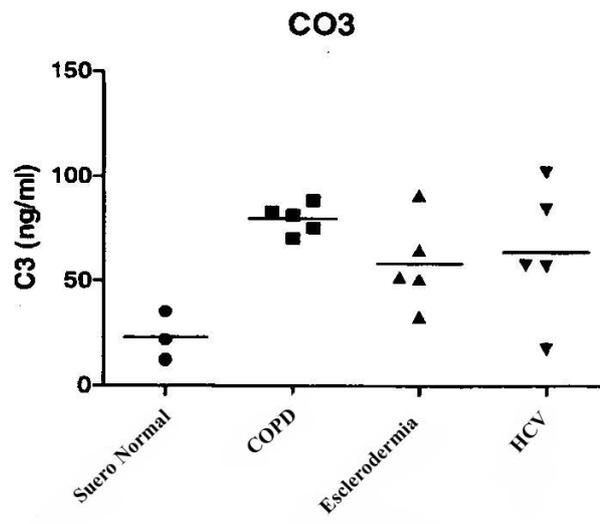


Figura 3

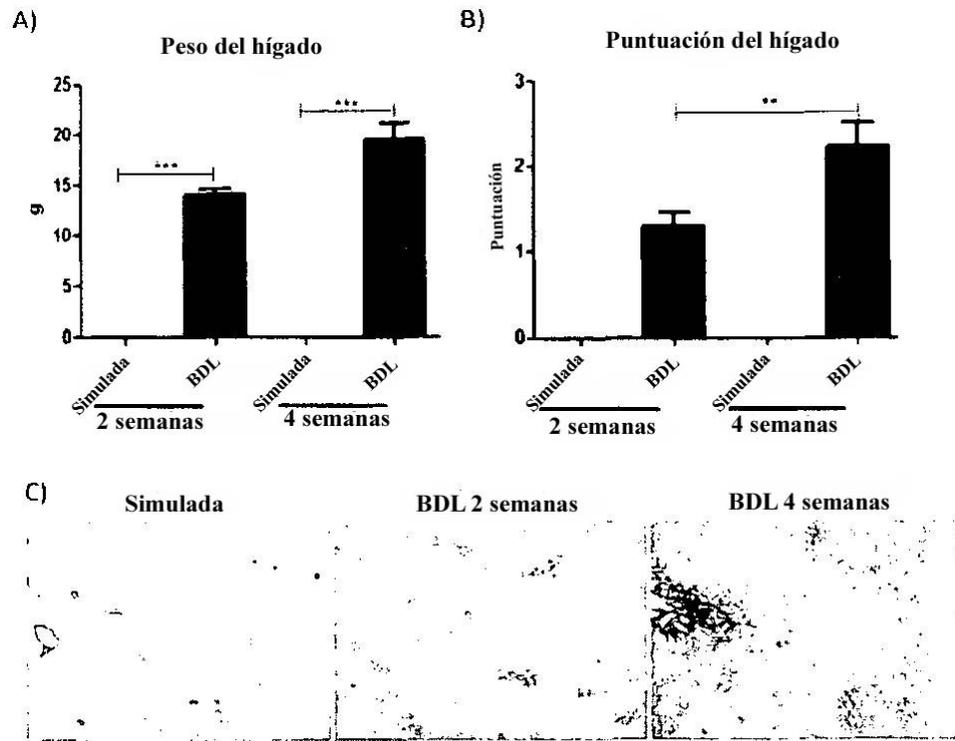


Figura 4

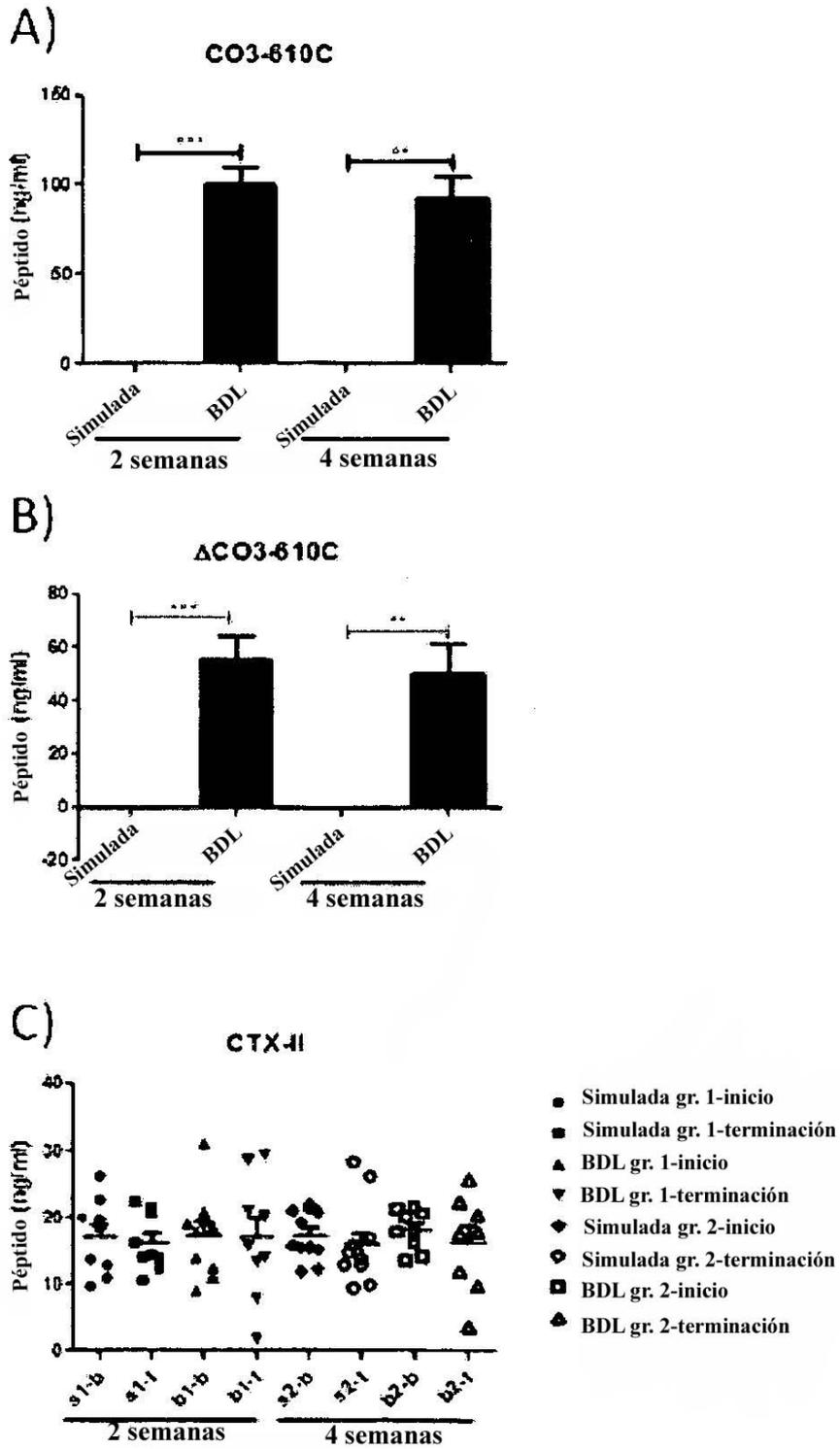


Figura 5

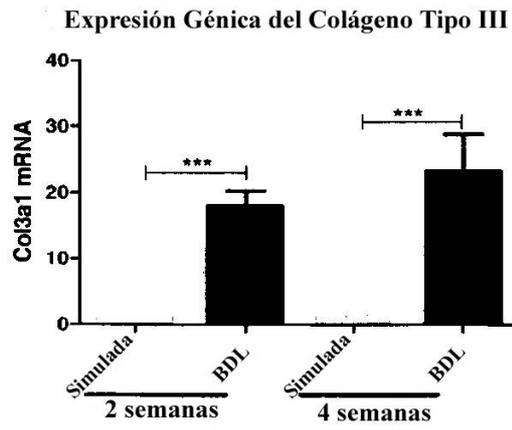


Figura 6

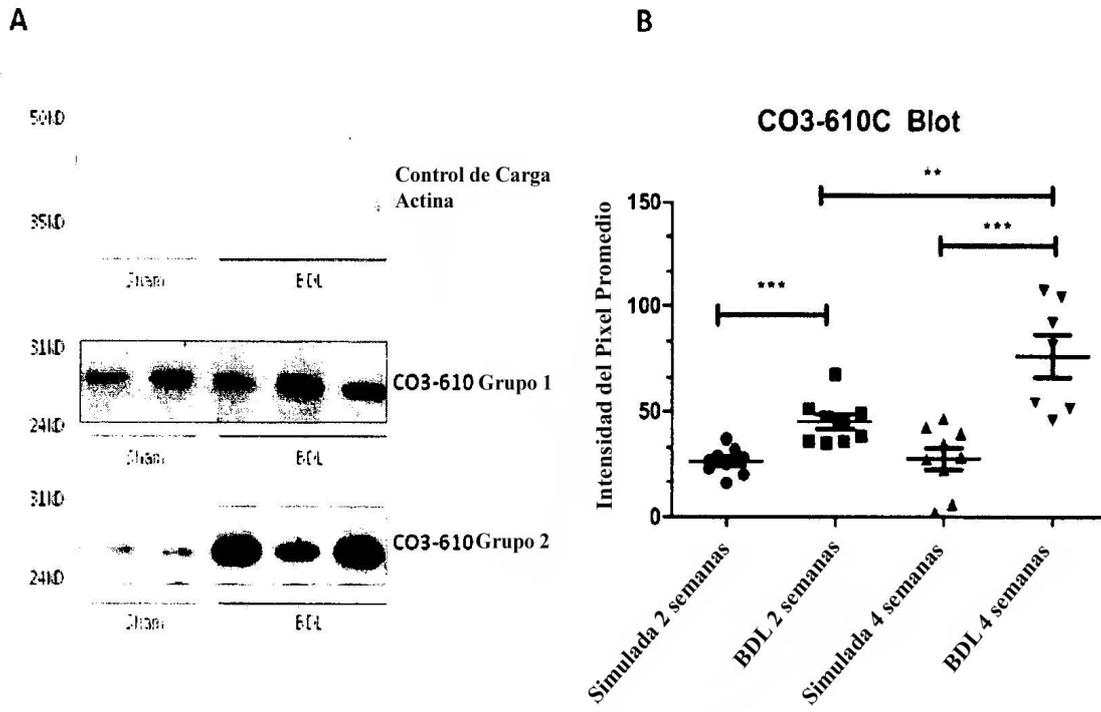
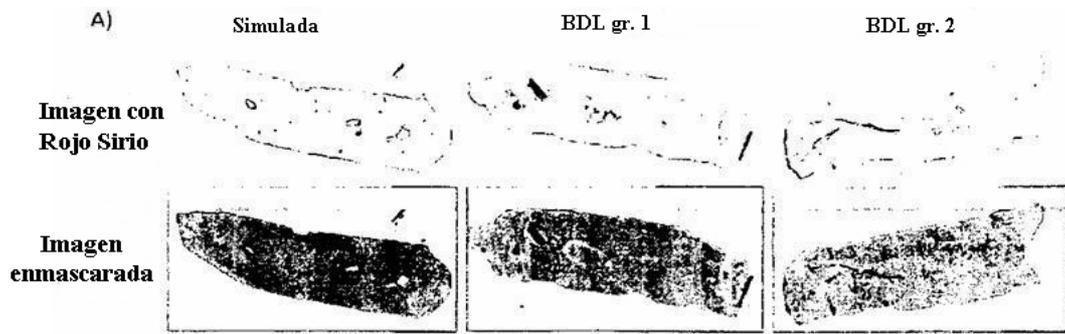


Figura 7



B) Colágeno total cuantificado mediante el Visiopharm

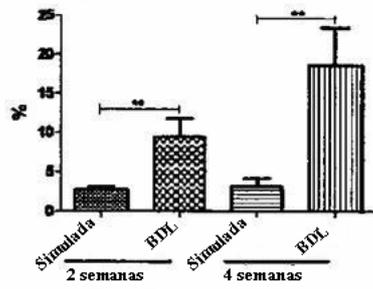


Figura 8

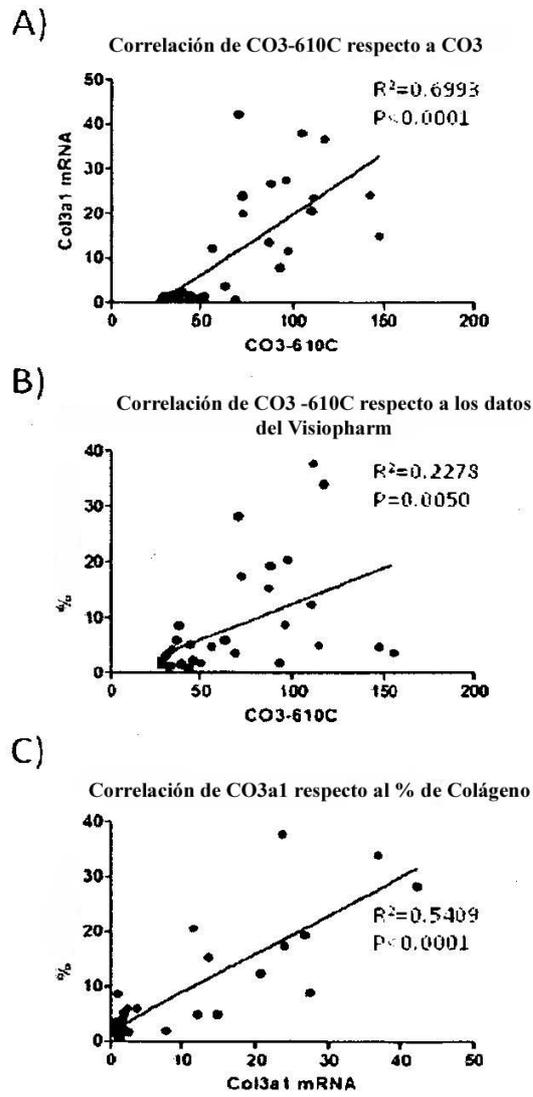


Figura 9

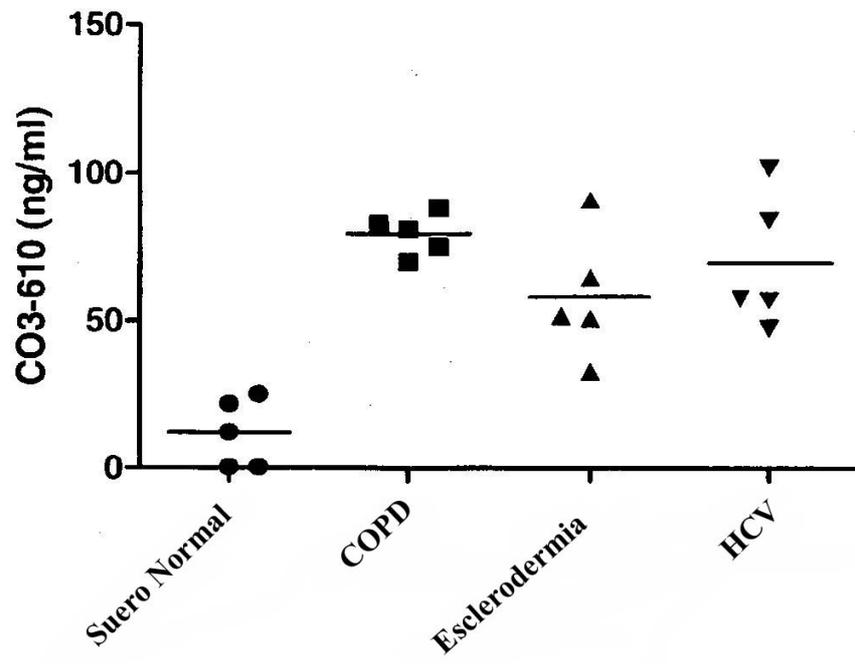


Figura 10

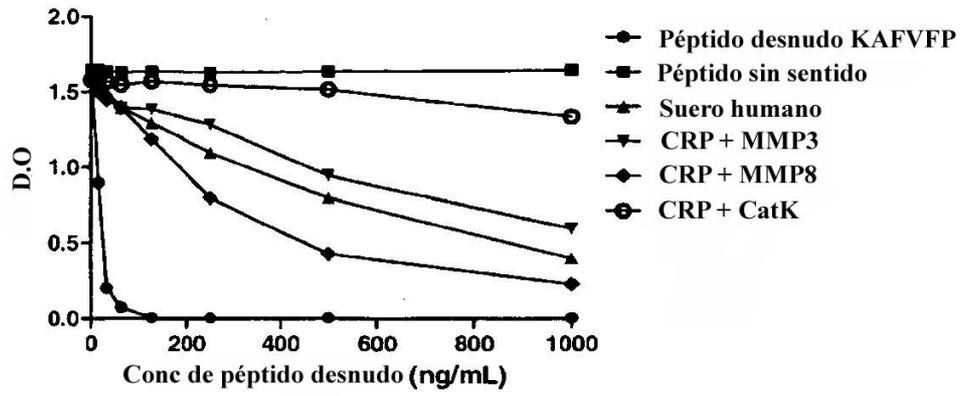


Figura 11

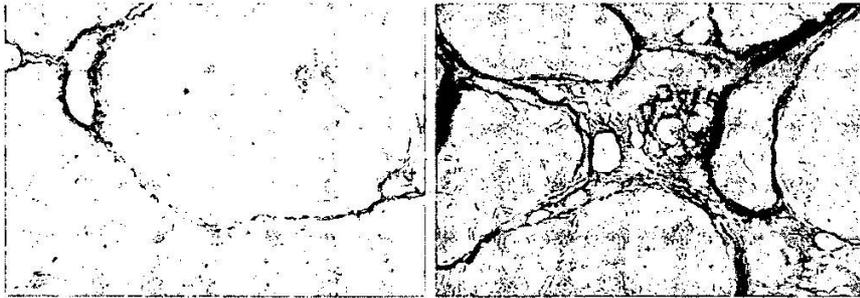


Figura 12

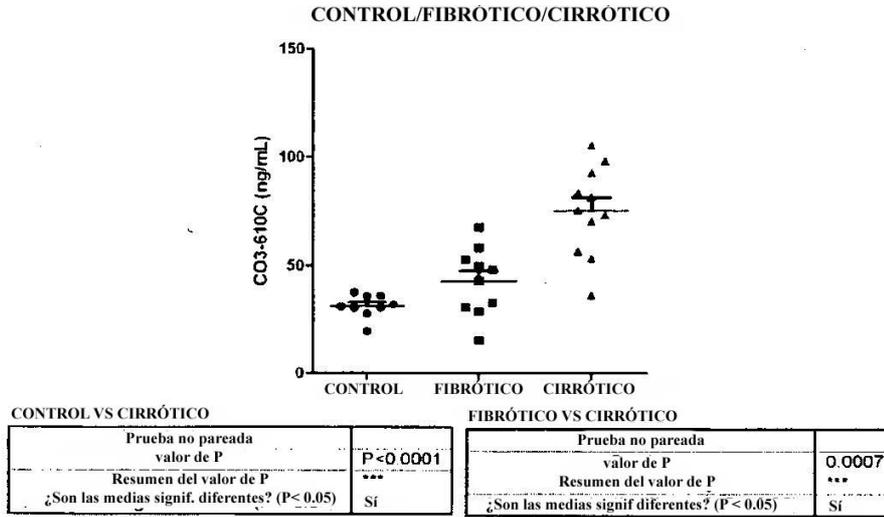


Figura 13

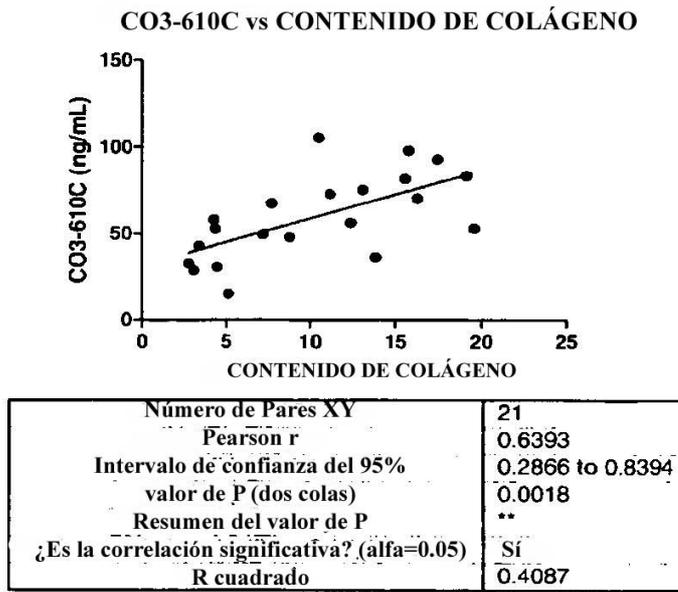


Figura 14

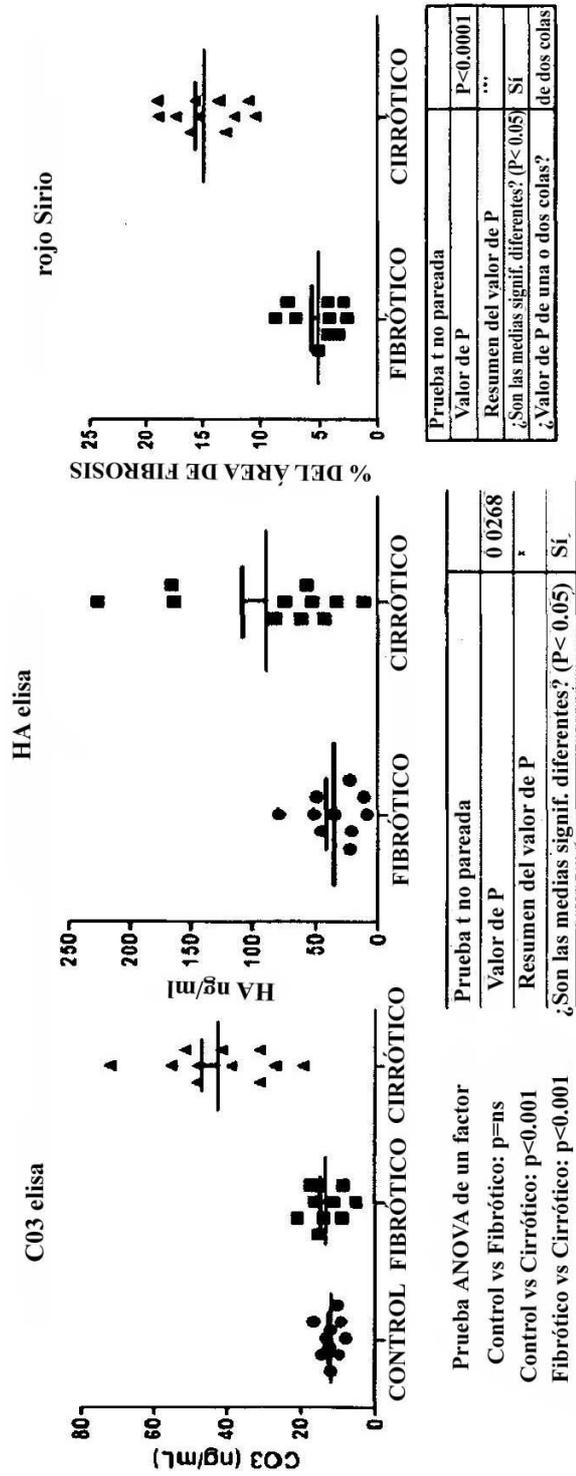


Figura 15

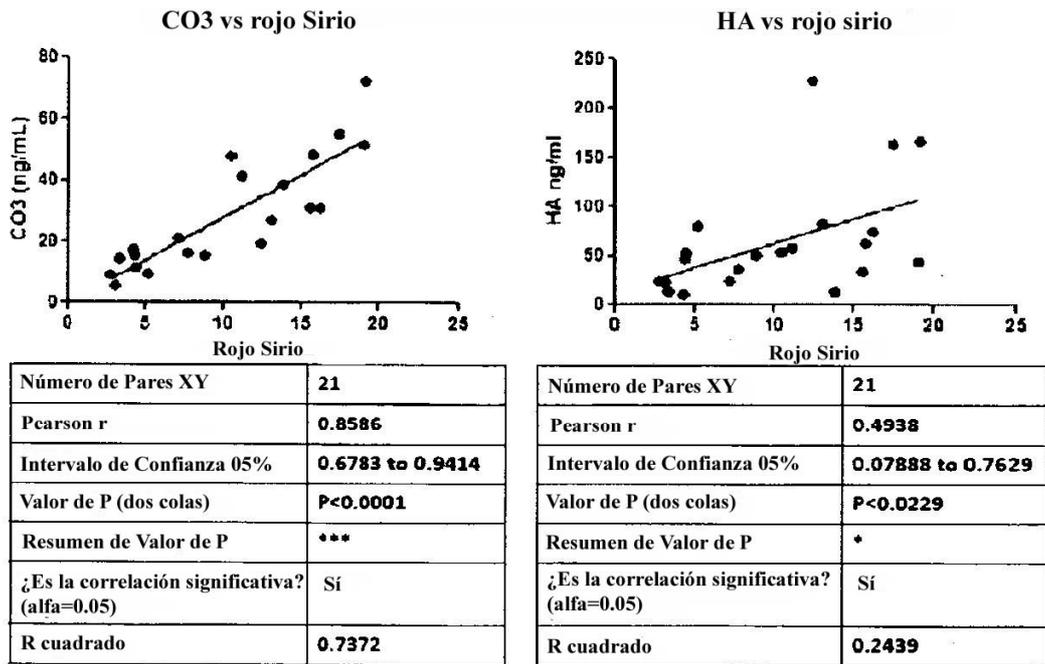


Figura 16

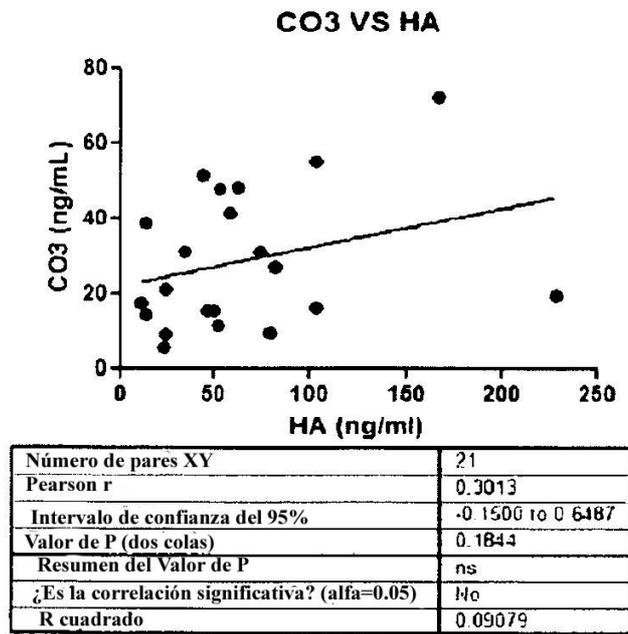


Figura 17

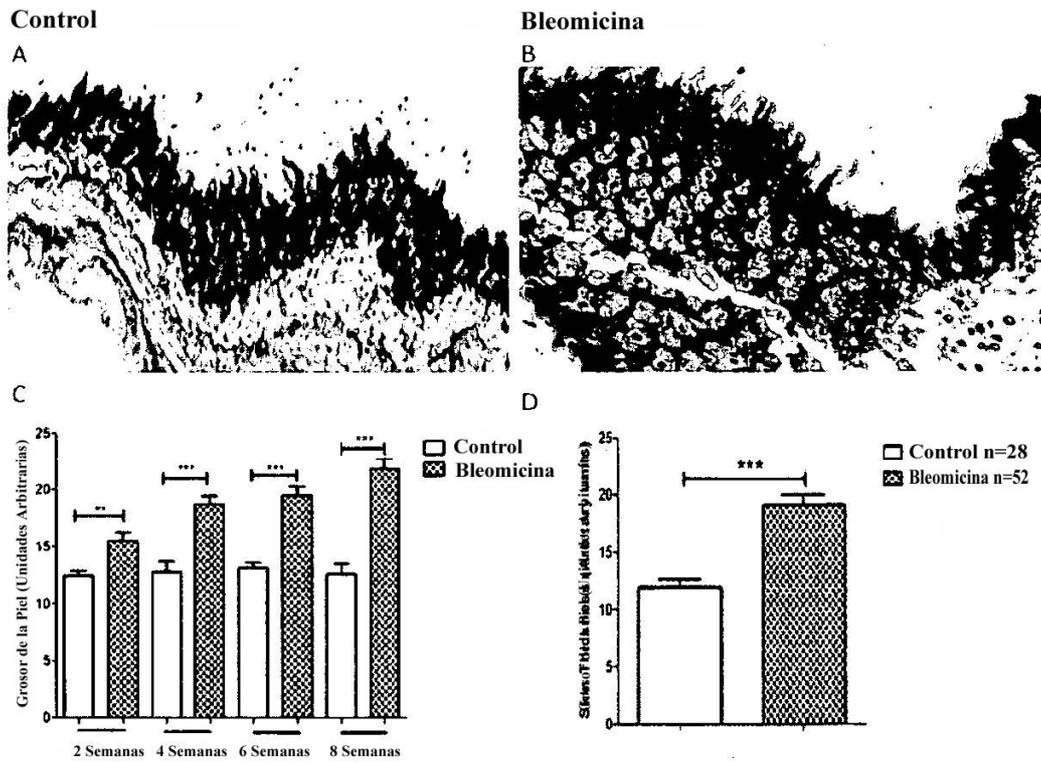


Figura 18

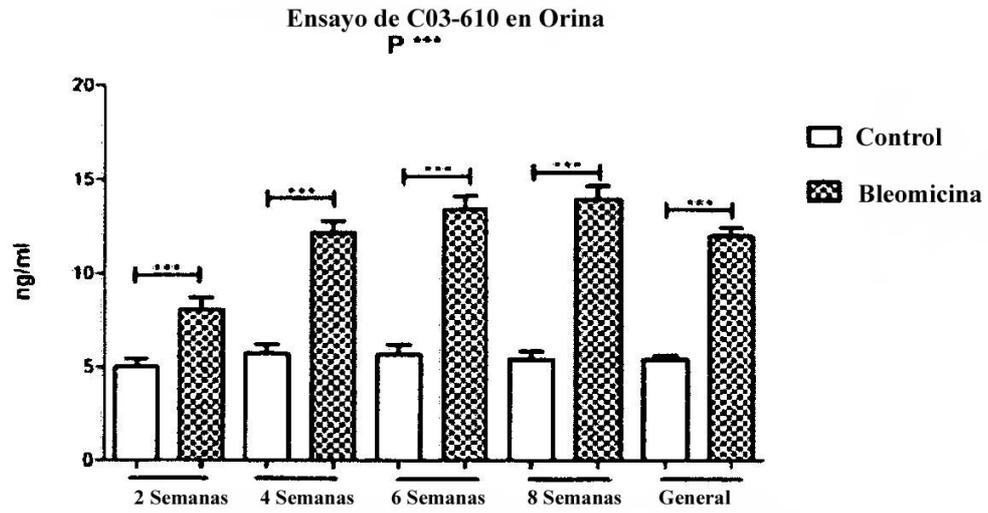


Figura 19

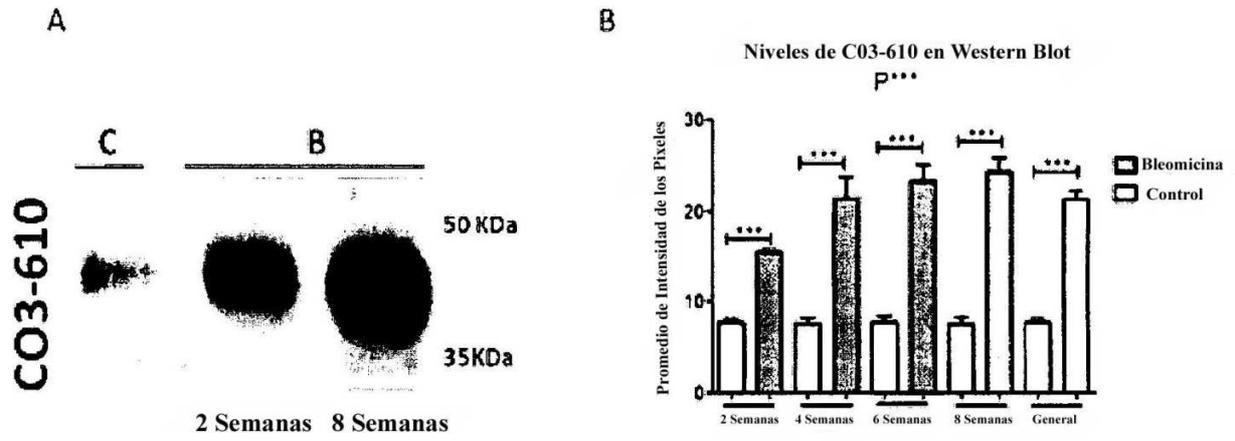


Figura 20

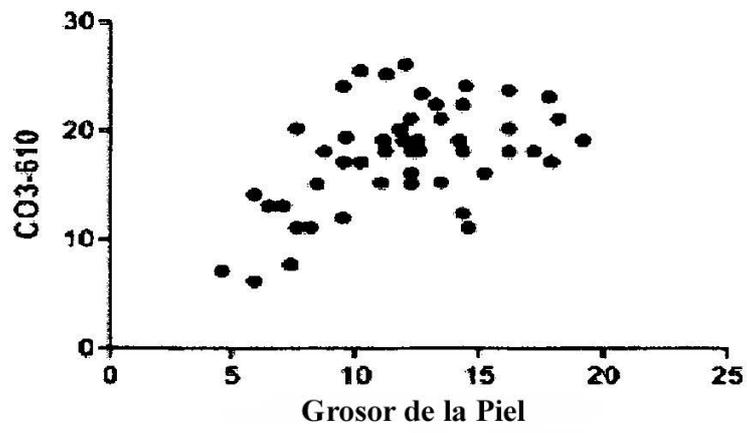


Figura 21

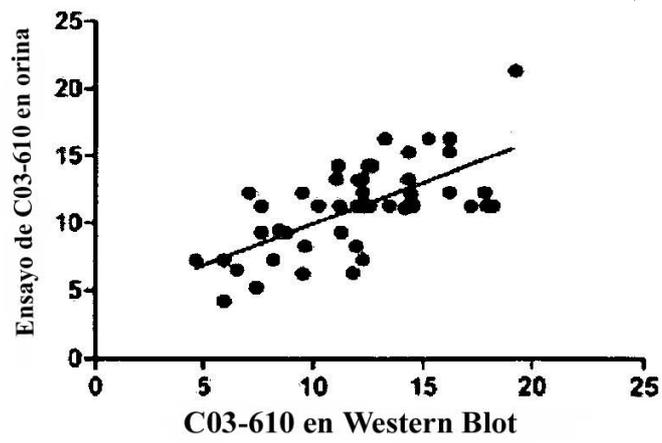


Figura 22