

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 971**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 09814303 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2333552**

54 Título: **Nuevos biomarcadores para la enfermedad de hígado graso no alcohólico y métodos para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico que emplean dichos biomarcadores**

30 Prioridad:

**19.09.2008 JP 2008241863**

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

**19.05.2015**

73 Titular/es:

**MCBI INC. (100.0%)  
9-29, Matsushiro 4-chome Tsukuba-shi  
Ibaraki 305-0035, JP**

72 Inventor/es:

**MENO, KOHJI y  
SUZUKI, HIDEAKI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 971 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

Nuevos biomarcadores para la enfermedad de hígado graso no alcohólico y métodos para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico que emplean dichos biomarcadores

### Campo Tecnológico

- 5 La presente invención se refiere a nuevos biomarcadores para la enfermedad de hígado graso no alcohólico y a métodos para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico que emplean dichos biomarcadores.

### Antecedentes Tecnológicos

10 Los medios usados habitualmente para diferenciar entre un estado normal y uno no normal de un sujeto humano en base a material biológico suyo son los que se han usado mayoritariamente en diagnóstico. Los métodos usados más frecuentemente son aquellos dirigidos a biomarcadores sanguíneos. En este ámbito se ha realizado la determinación comparativa de la cantidad de una proteína o péptido específicos que tenga un peso molecular inferior a 10.000 o, en el caso de una proteína enzimática, que presente actividad enzimática en muestras procedentes de sujetos normales (sanos) y de individuos enfermos para ayudar en la diagnosis. Aquí, antes de la evaluación de muestras reales, se realizan mediciones sobre una serie de muestras procedentes de controles sanos y de pacientes con una determinada enfermedad, en relación a la(s) cantidad(es) o actividad(es) de proteínas o péptidos individuales o múltiples específicos y a los rangos de valores normales y anormales. La muestra a evaluar se analiza a continuación mediante el mismo método y el valor resultante se juzga en función de si está en el rango normal o en el rango anormal.

20 En las medidas reales, se determina la(s) cantidad(es) de proteína(s) o péptido(s) específico(s) en las muestras de ensayo, tal cual o tras dilución, mediante el uso de un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA, del inglés "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") que usa anticuerpos primarios, o secundarios, marcados con una enzima que reacciona con un sustrato que produce un color al reaccionar, inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA), radioinmunoensayo (RIA) que usa un anticuerpo primario, o secundario, marcado con un radioisótopo, y, si la proteína es una enzima, la medición de la actividad de la enzima añadiendo su sustrato y determinando la intensidad del color producido, etc. Estos métodos basados en anticuerpos se denominan métodos de marcaje con enzima, fluorescencia o radioisótopo, respectivamente. Adicionalmente, existe un método en el que se determina un producto de reacción enzimática derivado del correspondiente sustrato mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, existe un método en el que la HPLC se combina con un espectrómetro de masas, denominado LC-MS/MS, y existe un método denominado monitorización de reacción seleccionada (SRM)/monitorización de reacción múltiples (MRM) que utiliza LC-MS/MS. En otro método para determinar la concentración en una muestra, ésta es pretratada apropiadamente y se logra la separación de proteínas o péptidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), y la proteína o péptido diana se determina mediante tinción con plata, tinción con azul Coomassie o tinción inmunológica (ensayo Western) que usa un anticuerpo para atacar una proteína o péptido. Adicionalmente, existe un método que utiliza espectrometría de masas para determinar la cantidad de proteína o péptido diana en muestras fraccionadas mediante cromatografía en columna. En lugar de cromatografía en columna, también se pueden utilizar chips proteínicos y esferas magnéticas para el propósito de pretratamiento.

35 Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado un método inmunoMS en el que una proteína o un péptido son capturados mediante partículas esféricas (que incluyen partículas esféricas magnéticas) con un anticuerpo ligado a la proteína o al péptido, son eluidos de las partículas esféricas y se determinan mediante espectrometría de masas. Además, se ha publicado el análisis de proteínas intactas mediante espectrometría de masas usando los métodos mencionados anteriormente tras digestión con tripsina, etc. (Documento de Patente 1). En la presente memoria, se seleccionan proteínas diana intactas tanto por fraccionamiento como por adsorción sobre un adsorbente específico para ellas, y a continuación se determinan mediante espectrometría de masas.

45 Para la enfermedad de hígado graso no alcohólico se utilizan las siglas NAFLD (del inglés "*Non-alcoholic fatty liver disease*") y los pacientes de esta enfermedad, a pesar del hecho de no tener un hábito de bebida (menos de 20 g diarios), generan resultados histológicos que se caracterizan por una deposición grasa hepática que recuerda a la que se da en el daño hepático alcohólico. Se excluyen enfermedades causadas por virus tales como el HCV o el HBV o el origen autoinmune. La enfermedad se considera un fenotipo de la obesidad que acompaña al síndrome metabólico hepático. La NAFLD se divide en hígado graso simple y esteatohepatitis no alcohólica. Esta última, abreviada con las siglas NASH, es una enfermedad progresiva. La NASH frecuentemente acompaña a una fibrosis y se sabe que a menudo progresa hacia la cirrosis hepática y después al cáncer hepático. Tales características han atraído la atención hacia esta enfermedad (Documento No Patente 1). A partir de este punto en la presente especificación el hígado graso simple se denominará hígado graso.

55 La aparición de hígado graso puede sospecharse en reconocimientos regulares a partir de la presencia de niveles elevados de triglicéridos en sangre y se puede diagnosticar mediante una ultrasonografía abdominal y una CT. Debe prestarse atención al hecho de que el 40% de los hígados grasos en pacientes que no beben vienen acompañados de daño hepático. A pesar de la observación de que el hígado graso no alcohólico progresa a NASH, no existe un test sanguíneo adecuado para NASH.

Aunque la NASH se considera un tipo grave de NAFLD, los análisis químicos sanguíneos rutinarios, específicamente los valores de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), aumentan solo ligeramente y a menudo la enfermedad es pasada por alto. Por lo tanto, se ha destacado que es un punto importante que requiere resolución debido a que no existe un método de ensayo específico para detectarla, como en el caso del hígado graso.

Previamente, la secuencia de las proteínas o péptidos de cadena  $\alpha$  de fibrinógeno que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la SEQ ID N° 1; fibrinopéptido de tipo A que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la SEQ ID N° 3; el complemento C4A que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la SEQ ID N° 5; el inhibidor inter- $\alpha$ -tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la SEQ ID N° 7; y un péptido parcial del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la SEQ ID N° 17, han sido descritos como biomarcadores para la detección de cáncer hepático (Entrada de la Base de Datos WPI con número de acceso AN 2007-061341 y Documento de Patente 2).

### Documentos previos

Documento de Patente 1, JP-A-2004-333274

Documento de Patente 2, JP-A-2006-308533

Documento No Patente 1, "A Guide to Diagnosis and Treatment of NASH and NAFLD", editado por la Asociación Japonesa de Hepatología, 2006 (en japonés).

Documento No Patente 2, Benkirane, N. et al, J. Biol. Chem. Vol. 268, 26279-26285, 1993.

### Sumario de la invención

#### Problemas a resolver por la invención

La presente invención está dirigida a presentar métodos de detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico, que incluye esteatohepatitis no alcohólica, usando una proteína o su péptido parcial que difiere en la presencia o la ausencia, o en la cantidad entre sujetos humanos sanos y pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica, y además está dirigida a presentar biomarcadores que comprenden dicha proteína y dicho péptido parcial que van a ser usados para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico, que incluye esteatohepatitis no alcohólica.

#### Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores investigaron para descubrir los medios para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico y descubrieron un fragmento de proteína y un péptido parcial del mismo que son capaces de detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico, que incluye esteatohepatitis no alcohólica, entre biomarcadores de enfermedades hepáticas que los presentes investigadores habían descubierto con anterioridad.

Específicamente, los presentes inventores descubrieron que un fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia n° 2 y su péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia n° 3 (que incluye su forma glicada) de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácido expresada por la Secuencia N° 1 podrían usarse como biomarcadores para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico, incluyendo la esteatohepatitis no alcohólica.

Los presentes inventores han llevado la presente invención a la perfección alcanzando un éxito adicional en la determinación de dicho fragmento de proteína y su péptido parcial usando un procedimiento de inmunotinción y un método inmunoMS, y confirmando la posibilidad de construir un ELISA.

Las características de la invención se muestran a continuación y la presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, se refiere a los siguientes puntos:

1. Uso de un biomarcador para la detección in vitro de una enfermedad de hígado graso no alcohólico, donde dicho biomarcador comprende al menos una proteína o péptido seleccionado del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, un fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y un péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

2. Uso de un biomarcador en la detección in vitro de esteatohepatitis no alcohólica que comprende al menos una proteína o péptido seleccionados del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia expresada por la Secuencia N° 1, un fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 de precursor de cadena pesada H4 de

inhibidor de inter-alfa-tripsina, y un péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

- 5 3. Un método para la detección de enfermedad de hígado graso no alcohólico que implica la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en el punto 1.
4. Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica que implica la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en el punto 2.
- 10 5. Un método para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en el que se determina que el paciente padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico cuando, tras la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en el punto 1, se observa que dicho biomarcador está presente en una cantidad mayor que en los controles normales.
- 15 6. Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica en el que se determina que el paciente padece esteatohepatitis no alcohólica cuando, tras la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para esteatohepatitis no alcohólica descrito en el punto 2, se observa que dicho biomarcador está presente en una cantidad mayor que en los controles normales.
- 20 7. Un método para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en el punto 3 o en el punto 5, donde la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotinción, ensayo de transferencia Western blot, método de anticuerpos marcados enzimáticamente, con fluorescencia o con radioisótopos, espectrometría de masas, método inmunoMS o método de resonancia de plasmón superficial.
8. Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica descrito en el punto 4 o en el punto 6, donde la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotinción, ensayo de transferencia Western blot, método de anticuerpos marcados enzimáticamente, con fluorescencia o con radioisótopos, espectrometría de masas, método inmunoMS o método de resonancia de plasmón superficial.
- 25 9. El uso de un kit para la detección in vitro de enfermedad de hígado graso no alcohólico para determinar al menos un biomarcador descrito en el punto 1, conteniendo dicho kit un anticuerpo o un aptámero de al menos un biomarcador descrito en el punto 1.
10. El uso de un kit para la detección in vitro de esteatohepatitis no alcohólica para determinar al menos un biomarcador descrito en el punto 2, conteniendo dicho kit un anticuerpo o un aptámero de al menos un biomarcador descrito en el punto 2.
- 30 11. El uso de un kit para la detección in vitro según el punto 9 o el punto 10, donde dicho anticuerpo o aptámero se solidifica sobre una placa o placas.

Además, se describe un biomarcador para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico que comprende un fragmento de proteína o péptido no inferior a 5 residuos de aminoácido que tiene su origen en al menos una proteína o péptido seleccionado del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, un fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada o la Secuencia N° 2 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

Además, también se describe un biomarcador para la detección de esteatohepatitis no alcohólica que comprende un fragmento de proteína o péptido no inferior a 5 residuos de aminoácido que tiene su origen en al menos una proteína o péptido seleccionado del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, un fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada o la Secuencia N° 2 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

#### **Efecto ventajoso de la invención**

Según la presente invención, es posible diagnosticar si un sujeto padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica mediante la determinación en un material biológico obtenido de dicho sujeto del tipo y cantidad de al menos una proteína o al menos un péptido parcial derivado por digestión, etc., de dicha proteína seleccionada del grupo que consiste en el precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

La presente invención presenta un sistema de diagnosis que destaca tanto en precisión como en especificidad. La presente invención permite la diagnosis con alta precisión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica, para las que no ha habido métodos de ensayo específicos desarrollados para materiales biológicos tales como la sangre. También es posible con la presente invención diagnosticar el grado de progreso de la enfermedad hepática hacia cáncer hepático. Además, los biomarcadores descritos en la presente invención son muy útiles para evaluar la eficacia de fármacos.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: ilustra los resultados de aplicar el método de inmunotinción con BMPEP1117R como anticuerpo primario en pacientes con hígado graso (FL, del inglés "fatty liver"), esteatohepatitis no alcohólica (NS, del inglés "nonalcoholic steatohepatitis") y hepatitis crónica (CH, del inglés "chronic hepatitis").

Figura 2: demuestra que la inmunotinción presentada en la Figura 1 del Ejemplo 2 determinó el fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

Figura 3: ilustra los resultados de la determinación mediante el método de inmunoMS de la concentración en suero de péptido parcial glicado que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, donde se muestran como NR los controles sanos.

Figura 4: ilustra la representación de puntos correspondientes a las concentraciones de suero determinadas mediante el método de inmunoMS de péptido parcial glicado que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, donde se comparan hígado graso (FL) y NASH.

Figura 5: muestra la curva ROC y el valor para AUC de las concentraciones en suero determinadas mediante el método inmunoMS de péptido parcial glicado que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y demuestra que dicho péptido parcial es capaz de diagnosticar diferencialmente entre hígado graso (FL) y NASH.

Figura 6: ilustra el hecho de que el BMPEP1117R realmente capturó el fragmento de proteína de 35 kDa del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y que el fragmento capturado reaccionó con un anticuerpo específico de su extremo C (BMPEP1117C).

### Descripción de las realizaciones

La presente invención es un método para determinar el tipo y la cantidad de proteína intacta y/o de su péptido parcial cuando el sujeto evaluado padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica, así como para diagnosticar si el sujeto evaluado padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica, y, si al sujeto evaluado se le diagnostica que padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica, para elucidar el grado de progreso de la enfermedad hepática. Generalmente se dice que un péptido es una entidad química, obtenida por polimerización de varios aminoácidos, con un peso molecular inferior a 10.000, o por polimerización de entre varios y menos de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. Aunque en la presente invención se puede usar un péptido parcial de una proteína intacta como biomarcador para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica, dicho péptido parcial se define como un péptido con un peso molecular inferior a 10.000 que consiste en un parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína intacta. Dicho péptido puede aparecer como un péptido parcial durante la expresión por transcripción seguida de la síntesis por traducción antes de madurar en una proteína intacta, o como un péptido producido por digestión enzimática en el organismo después de que se haya sintetizado la proteína intacta. Es posible que, cuando el organismo se encuentra en un estado anormal por padecer una enfermedad como la de hígado graso no alcohólico o la esteatohepatitis no alcohólica, el mecanismo para la síntesis y regulación de la proteína se vea desregulado. En otras palabras, la presente invención también es un método para determinar si el sujeto evaluado se encuentra en un estado normal o si padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o la esteatohepatitis no alcohólica usando como indicador el grado de síntesis de proteína y/o digestión de proteína. La detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica en la presente invención implica la evaluación y la diferenciación, es decir, la diagnosis de si el sujeto evaluado padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica.

También se describe la evaluación del riesgo del paciente de padecer una enfermedad hepática más grave.

Específicamente, en el método de la presente invención, los ejemplos de proteína intacta que pueden usarse como biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica incluyen el precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1 y el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2. Otros biomarcadores adicionales de la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica de la presente invención incluyen cualquier fragmento de proteína con un peso molecular superior a 10.000 que proceda del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que

consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1 y el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2.

Adicionalmente, un ejemplo de biomarcadores para la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica, tal como se describe en la presente memoria, incluye el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácido expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina. Tal como se describe en la presente memoria, las proteínas y los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácido derivadas de las Secuencias N° 1 a 3 por eliminación, intercambio y/o adición de uno o varios aminoácidos, pueden usarse como biomarcadores y se incluyen en la presente descripción. “Uno o varios” aquí significa “uno o tres”, “uno o dos” o “uno”. Además, los péptidos parciales que pueden usarse como biomarcadores en la presente descripción incluyen los fragmentos de péptido que consisten en no menos de 5 residuos de aminoácido procedentes respectivamente del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina. La base para la limitación de fragmentos de péptido que consisten en no menos de 5 residuos de aminoácido se encuentra en la descripción presentada a continuación en el Documento No Patente 2. El documento muestra que un anticuerpo obtenido usando el péptido IRGERA como inmunógeno, que es el extremo C (130-135) de la histona H3, reconoció al péptido IKGGERA derivado del intercambio de K por R y al péptido CGGGERA que fue derivado por eliminación de IR seguido de la adición de CGG. Esto demuestra que la inmunogenicidad (antigenicidad) es reconocida por un péptido de no menos de 4 residuos de aminoácido. A fin de extrapolar este descubrimiento a otros péptidos diferentes del extremo C de la histona H3, en la presente descripción el número de residuos de aminoácido se define como no inferior a 5 en lugar de 4. Hacer de dicho péptido de tan bajo peso molecular el objetivo de la presente descripción es importante cuando el método de detección y diferenciación emplea medios inmunológicos que incluyen la inmunotinción, ELISA e inmunoMS.

Cabe destacar que existen casos en los que se ha añadido una cadena de azúcares o varias cadenas de azúcares a una proteína intacta o a su péptido parcial para formar entidades glicadas. Las proteínas y los péptidos parciales en forma glicada también pueden usarse como biomarcadores para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de la esteatohepatitis no alcohólica. Un ejemplo de dichos péptidos glicados es el péptido de la Secuencia N° 3.

También cabe destacar que, en la presente invención, se puede cuantificar el biomarcador o se puede determinar cualitativamente su presencia o su ausencia.

Se puede usar la electroforesis bidimensional (2-DE) o la cromatografía bidimensional (2-DC) en la presente descripción para separar biomarcadores en materiales biológicos que incluyen suero. Se pueden seleccionar métodos cromatográficos conocidos de entre la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de filtración en gel. También es posible realizar la cuantificación con el método SRM/MRM en tecnología LC-MS/MS. Adicionalmente, el método inmunoMS desarrollado por los presentes inventores, en el que se capturan la proteína o el péptido diana sobre partículas esféricas (que incluyen esferas magnéticas) con anticuerpos ligados a la proteína o al péptido, se eluyen de las partículas esféricas y se determinan mediante espectrometría de masas, permite una determinación adecuada de la presencia o ausencia o de la cantidad de proteína diana, fragmento de proteína diana o péptido diana sin usar 2-DE o cromatografía.

Se describe que es posible, mediante el uso del método descrito en la presente memoria, evaluar el riesgo pronóstico de enfermedad de hígado graso no alcohólico en el sujeto evaluado y, por tanto, puede ser útil en medicina profiláctica. Además, cuando se administra una terapia de dieta y/o una terapia de fármacos a los pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico, la enfermedad progresa en la dirección de la curación y, por consiguiente, los tipos y las cantidades de proteínas y sus péptidos parciales cambian.

El tipo y la cantidad de una proteína en materiales biológicos se pueden determinar empleando diversos métodos. Si la proteína diana (que incluye el fragmento de proteína y el péptido parcial) ha sido caracterizada y cuando ya se ha obtenido un anticuerpo (anticuerpo primario) para ella, se pueden usar los siguientes métodos:

#### 50 1. Inmunotinción

Éste es uno de los métodos más sencillos. El suero evaluado en una cantidad fija (de aproximadamente 1 microlitro) tras dilución en serie se añade gota a gota sobre una membrana apropiada tal como de nitrocelulosa y se seca al aire. La membrana es tratada con una disolución bloqueante que contiene una proteína tal como BSA, se lava, se hace reacción con un anticuerpo primario, y se lava. Después, la membrana se hace reaccionar con un anticuerpo secundario marcado para detectar el anticuerpo primario. La membrana se lava y el marcaje se visualiza para medir su densidad.

## 2. Tinción Western (Western blotting)

Tras separación mediante electroforesis unidimensional o bidimensional, que implica enfoque isoeléctrico o SDS-PAGE, las proteínas son transferidas sobre una membrana apropiada, tal como de nitrocelulosa, y se determinan sus cantidades, como en la inmunotinción mencionada antes, usando anticuerpo primario y anticuerpo secundario marcado.

## 3. ELISA

El anticuerpo de la proteína o de su péptido parcial se fija en una placa tal como una placa de microtitulación modificada químicamente. Se aplican las cantidades apropiadas de muestras tras dilución en serie a la placa y se incuban. Las proteínas y los péptidos no capturados son eliminados mediante un lavado. A continuación la placa se incuban con anticuerpo secundario marcado con una sustancia o enzima fluorescente o quimioluminiscente. Tras añadir el respectivo sustrato, se mide la fluorescencia, quimioluminiscencia o luz visible originada por reacción de la enzima y se evalúa e interpreta.

A continuación se ilustran ejemplos adicionales de métodos (véase el Documento de Patente 2) pero la invención no está limitada por dichos ejemplos.

## 4. Métodos que usan microsistemas (microchip)

Un microsistema es un término general para referirse a dispositivos en los que se han dispuesto sobre un soporte sólido (placa) materiales solidificados con afinidad por las sustancias diana. En la presente descripción, se disponen anticuerpo o aptámeros de las proteínas y péptidos parciales. Se coloca una muestra de material biológico sobre el microsistema para fijación de las proteínas diana o de los péptidos parciales diana y a continuación se incuban el microchip con anticuerpo secundario marcado con una sustancia o enzima fluorescente o quimioluminiscente. Tras la adición del respectivo sustrato, se mide la fluorescencia, la quimioluminiscencia o la luz visible debidas a la reacción enzimática.

## 5. Espectrometría de masas

En la espectrometría de masas, por ejemplo, un anticuerpo de una proteína o péptido parcial específicos es unido a micropartículas esféricas o a una placa modificadas químicamente (chip de proteínas). Las micropartículas podrían ser partículas magnéticas. No existen requisitos para el material de la placa. El anticuerpo que va a usarse podría ser (1) un anticuerpo que reconozca la forma de longitud completa de la proteína especificada únicamente, (2) un anticuerpo que reconozca solo un péptido parcial, (3) todos los anticuerpos que reconocen tanto la proteína especificada como su péptido parcial, o una combinación de (1) y (2), (1) y (3) ó (2) y (3). Se añaden las muestras, tras dilución en serie con el disolvente original o con una disolución tampón, a las micropartículas o placa que portan el anticuerpo o anticuerpos y se incuban. Las proteínas y péptidos parciales no capturados son eliminados mediante lavado. La proteína o péptido parcial capturados por las micropartículas o la placa son eluidas, y se analizan mediante espectrometría de masas con MALDI-TOF-MS, SELDI-TOF-MS, etc. Se realizan las mediciones con respecto a la masa y la intensidad del pico debido a la proteína, fragmento de proteína o péptido parcial. Antes de las medidas, se añade al material biológico original una cantidad fija de sustancia que actúa como patrón interno y también se mide la intensidad de su pico. La concentración de la diana en el material biológico original se puede calcular a partir de la relación de intensidades de pico de la diana y el patrón interno. Esto se denomina método inmunoMS. Adicionalmente, es posible realizar la cuantificación, tras diluir la muestra con disolvente original o tampón, o tras eliminar parte de las proteínas, mediante separación con HPLC seguida de espectrometría de masas con un método de ionización de electropulverización (ESI, del inglés "electrospray ionization"). En este punto se puede usar el método SMR/MRM para la cuantificación absoluta con el uso de un péptido de patrón interno marcado con un isótopo.

Adicionalmente, además de los métodos mencionados anteriormente, es posible analizar proteínas y péptidos parciales usando 2-DE, resonancia de plasmón superficial, etc.

La presente invención incluye el método para detectar la enfermedad de hígado graso no alcohólico o de esteatohepatitis no alcohólica a partir de la presencia o la ausencia del biomarcador mencionado anteriormente tras aplicar el material biológico obtenido del sujeto evaluado a 2-DE o a resonancia de plasmón superficial.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que en modo alguno son limitantes.

### Ejemplo 1. Preparación de anticuerpo (BMPEP1117R) específicos al extremo N de la Secuencia N° 2

Se inmunizaron conejos con RLAILPASC-KLH y, tras un determinado periodo de tiempo, se les tomaron muestras de sangre, y se obtuvo el anticuerpo a partir de las mismas mediante purificación por adsorción sobre una columna a la cual se ha unido el péptido correspondiente. La Secuencia N° 2 es parte de la Secuencia N° 1. La Secuencia N° 3 está localizada en el extremo N de la Secuencia N° 2 y el péptido que consiste en la Secuencia N° 3 se detecta en los sueros de los pacientes con enfermedad de hígado.

Secuencia N° 1: Precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

001 MKPPRPVRTC SKVLVLLSLL AIHQTTTAEK NGIDIYSLTV DSRVSSRFAH  
 051 TVVTSRVVNR ANTVQEATFQ MELPKKAFIT NFSMNIDGMT YPGIIEKAE  
 101 AQAQYSAAVA KGKSAGLVKA TGRNMEQFQV SVSVAPNAKI TFEVLYEELL  
 151 KRRLGVYELL LKVRPQQLVK HLQMDIHIFE PQGISFLETE STFMTNQLVD  
 201 ALTTWQNKTK AHIRFKPTLS QQQKSPEQQE TVLDGNLIIR YDVDRAISGG  
 251 SIQIENGYFV HYFAPEGLTT MPKNVVFVID KSGSMSGRKI QQTREALIKI  
 301 LDDLSPRDQF NLIVFSTEAT QWRPSLVPAS AENVNKARSF AAGIQALGGT  
 351 NINDAMLMAY QLLDSSNQEE RLPEGSVSLI ILLTDGDPTV GETNPRSIQN  
 401 NVREAVSGRY SLFCLGFGFD VSYAFLEKLA LDNGGLARRI HEDSDSALQL  
 451 QDFYQEVANP LLTAVTFEYP SNAVEEVTQN NFRLLFKGSE MVVAGKLQDR  
 501 GPDVLTATVS GKLPTQNITF QTESSVAEQE AEFQSPKYIF HNFMERLWAY  
 551 LTIQQLLEQT VSASDADQQA LRNQALNLSL AYSFVTPLTS MVVTKPDDQE  
 601 QSQVAEKPMG GESRNRNVHS GSTFFKYLLQ GAKIPKPEAS FSPRRGWNRR  
 651 AGAAGSRMNF RPGVLSSRLL GLPGPPDVPD HAAYHPFRRL AILPASAPPA  
 701 TSNPDPVSR VMNIKIEETT MTTQTPAPIQ APSAILPLPG QSVERLCVDP  
 751 RHRQGPNVLL SDPEQGVVET GQYEREKAGF SWIEVTFKNP LVVWHASPEH  
 801 VVVTRNRRSS AYKWKETLFS VMPGLKMTMD KTGLLLLSDP DKVTIGLLFW  
 851 DGRGEGRLRL LRDTDRFSSH VGGTLGQFYQ EVLWGSPAAS DDGRRTLVRQ  
 901 GNDHSATRER RLDYQEGPPG VEISCWSVEL

5 Secuencia N° 2: fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

001 RLAILPASAP PATSNPDPV SRVMNIKIEE TMTTQTPAP IQAPSAILPL  
 051 PGQSVERLCV DPRHRQGPVN LLSDPQGVVET VTGQYEREKA GFSWIEVTFK  
 101 NPLVWVHASP EHVVVTRNRR SSAYKWKETL FSVMPGLKMT MDKTGLLLLS  
 151 DPKVTIGLL FWDGRGEGLR LLLRDTDRFS SHVGGTLGQF YQEVWLGSPA  
 201 ASDDGRRTLRL VQGNDSATR ERRLDYQEGP PGVEISCWSV EL

Secuencia N° 3: Péptido parcial de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

**RLAILPASAPPATSNPD**

El péptido descrito anteriormente estaba presente en el suero en estado glicado mostrado a continuación.

10 **RLAILPASAPPATSNPD + -GlcNAc-Hex-GlcNAc-Hex**

Ejemplo 2. Aplicación del método de inmunotinción usando BMPEP1117R como anticuerpo primario de sueros procedentes de controles sanos y pacientes con hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica y hepatitis crónica

15 Se usaron los siguientes materiales. Membrana, filtro de membrana MF-millipore de 0,22 µm; TBS, Tris-HCl 20 mM que contiene NaCl 0,15 M (pH 7,5); TBSt, TBS que contiene un 0,05% de Tween 20; disolución bloqueante, TBSt que contiene un 5% de BSA; BSA-TBSt, TBSt que contiene un 0,1% de BSA.

20 Los procedimientos fueron los siguientes. Se dibujaron rejillas de 5 mm de tamaño cada una sobre la membrana. Se añadió gota a gota 1 µL de muestra de suero prediluido con TBS sobre cada rejilla, la membrana se secó al aire y se sumergió en la disolución bloqueante. La membrana se lavó con TBSt, y se añadieron 2 mL de anticuerpo primario (BMPEP1117R, 0,68 µg/mL) en BSA-TBSt y se dejó reposar. A continuación la membrana se lavó con TBSt y se añadieron 2 mL del anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugada a HRP, 1:5000, GE Healthcare) en BSA-TBSt y se dejó reposar. La membrana se lavó varias veces con TBSt y se lavó además con TBS. Se midió la intensidad de quimioluminiscencia de cada punto. Muestras de suero procedentes de un paciente con hepatitis crónica, tras dilución en serie con TBS, fueron aplicadas a cada membrana y sirvieron como control.

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los valores medios mencionados anteriormente de relación de intensidades de manchas. FL significa pacientes con hígado graso, NS los que padecen NASH, y CH los que tienen hepatitis crónica. La línea punteada indica la relación de intensidades de 0,6 como valor umbral. Los casos que exceden dicho valor umbral fueron 0/5 en FL, 8/13 en NASH y 7/7 en CH. Con frecuencia se observaron valores incrementados en NASH. Como se mostrará en el Ejemplo 3, la intensidad observada en la inmunomancha refleja la concentración en suero del fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina. Por lo tanto, se demuestra que dicho fragmento de proteína de 35 kDa es útil en la detección no solo de hepatitis crónica sino también de la enfermedad de hígado graso, particularmente de NASH.

Ejemplo 3. Confirmación del hecho de que la inmunotinción del Ejemplo 2 determina realmente el fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

Antes del análisis, las muestras de suero fueron tratadas con el sistema "Agilent Multiple Affinity Removal System" (tamaño de columna, 4,6 mm x 100 mm) para eliminar albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina y antitripsina. De este modo, se mezcló suero (35  $\mu$ L) con 175  $\mu$ L de Tampón A, los materiales insolubles fueron eliminados usando un filtro centrífugo de 0,45  $\mu$ m y se aplicaron 200  $\mu$ L al sistema. Después de eso, se cargó el Tampón A con un caudal de 0,5  $\mu$ L/min durante 10 minutos. El caudal tratado fue concentrado con Microcon 10 (MILLIPORE) y, tras adición de tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0), concentrado adicionalmente hasta un volumen final inferior a 50  $\mu$ L. Una vez que el contenido de proteínas del concentrado fue determinado, 150  $\mu$ g del mismo fueron sometidos a SDS-PAGE (gel de acrilamida al 10%) seguido de un ensayo de transferencia Western. De este modo, el gel de SDS-PAGE fue transferido a una membrana de PVDF, el bloqueo se llevó a cabo leche desnatada al 5% en TBSt durante una noche, y la membrana se lavó con TBSt y se hizo reaccionar después con el anticuerpo primario (BMPEP1117R, 0,68  $\mu$ g/mL) durante 1 h seguido de un lavado con TBSt. A continuación, la membrana se hizo reaccionar con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugada a HRP, 1:5000, GE Healthcare) y se lavó con TBSt. La detección se llevó a cabo usando LAS3000 (Fuji Film).

La Figura 2 ilustra los resultados del ensayo anterior. Las IDs de las muestras para FL, NS y CH son idénticas a las mostradas en el Ejemplo 2. Una comparación con marcadores de peso molecular (PM) revela que las bandas están localizadas aproximadamente en 35 kDa. La Figura 2 también indica que no existe una banda que reacciones con el anticuerpo primario (BMPEP1117R) distinta a las bandas a aproximadamente 35 kDa. Esto indica adicionalmente que todos los datos de inmunotinción obtenidos en el Ejemplo 2 igualan a la suma de intensidades que resulta únicamente de dichas bandas. En otras palabras, la intensidad observada en el experimento de inmunotinción refleja la concentración en suero total del fragmento de proteína de 35 kDa del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina. La presencia de 3 ó 4 bandas se explica por la diversidad de cadenas de azúcares unidas a la proteína, ya que el fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina se sabe que está presente en isoformas que difieren en el grado de glicación con azúcares ácidos. Esto viene apoyado por el hecho de que, tal como se muestra en el Ejemplo 5, el uso de un anticuerpo específico para el extremo C del fragmento de proteína de 35 kDa del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina también revela bandas múltiples similares a las observadas en la Figura 2.

Ejemplo 4. Determinación de la concentración en suero mediante el método inmunoMS de péptido parcial en estado glicado (véase más adelante la Secuencia N° 3) que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

Las partículas esféricas usadas en el método inmunoMS se prepararon como se indica a continuación:

Las partículas magnéticas, de tipo Magosphere MS300/Carboxyl (JSR Co. Ltd, Tokio) fueron suministradas en suspensión (10 mg de partículas/mL). Se usó MES como MES 0,1 M (pH 5,0, se ajustó el pH con NaOH). EDC significa hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y se preparó justo antes de ser usado en la concentración de 10 mg/mL (52,2 mM) en MES enfriado en hielo. Se transfirió un mililitro de suspensión de partículas dispersas (10 mg de partículas) a un microtubo de 2,0 mL de capacidad. Las partículas magnéticas fueron separadas del sobrenadante mediante precipitación sobre una placa magnética y se lavaron con 1,0 mL de MES. Se añadió una disolución de anticuerpo, BMPEP1117R, a las partículas magnéticas y se agitó lentamente a temperatura ambiente. Se añadió EDC (100  $\mu$ L) y se agitó lentamente para permitir que la reacción tuviera lugar. El lavado con TBSt se repitió 4 veces y las partículas se almacenaron a 4°C en 1 mL de TBSt.

La medida usando el método inmunoMS comenzó con la adición de una cantidad fija de péptido puro marcado con isótopo estable como patrón interno en todas las muestras de suero. Se añadieron dos microlitros de disolución de péptido marcada con isótopo estable (100 fmol/ $\mu$ L) disueltos en TFA al 0,1%-acetonitrilo al 50% a 25  $\mu$ L de suero. Esta disolución se denominó "A". El péptido marcado con isótopo estable se obtuvo intercambiando  $^{12}\text{C}$  y  $^{14}\text{N}$  de la 6ª P de RLAILPASAPPATSNPD respectivamente por  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . El m/z [M+H]<sup>+</sup> medio para el péptido no marcado fue de 1691,93 mientras que para el péptido marcado fue de 1697,89. El objetivo de este ensayo era medir el péptido glicado con un m/z [M+H]<sup>+</sup> medio de 2422 en suero. Aunque era posible usar la forma no glicada del péptido RLAILPASAPPATSNPD para el calibrado, como se observó que sus concentraciones en suero eran muy bajas, para el calibrado se usó el péptido marcado con isótopo estable, en caso de que la concentración en suero del péptido no glicado en realidad pudiera varias significativamente.

La siguiente etapa fue el pretratamiento de la muestra de suero. La disolución "A" descrita anteriormente fue mezclada con 475  $\mu\text{L}$  de TFA al 0,1% y se calentó a 100°C durante 15 minutos. La mezcla se enfrió en hielo, se sometió a ultrasonidos y se centrifugó. El sobrenadante resultante fue transferido a microcon 10 (MILLIPORE) y se centrifugó a 14000 x g, a 4°C durante 80 minutos. El filtrado se mezcló con 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 0,3 M y un 0,2% de octilglucósido, y la mezcla resultante se usó como disolución de muestra para la siguiente etapa.

Los procedimientos para la inmunoprecipitación con las partículas magnéticas y la preparación de muestras para espectrometría de masa fueron los siguientes:

Se añadió la suspensión de partículas magnéticas (20  $\mu\text{L}$ ) a la disolución de muestra anterior y la mezcla se agitó lentamente. El lavado y la eliminación del sobrenadante se llevaron a cabo usando la placa magnética. El lavado se repitió varias veces con TBS y finalmente con bicarbonato de amonio 50 mM (pH 7,5). El péptido diana fue eluido de las partículas con 50  $\mu\text{L}$  de disolución de 2-propanol:H<sub>2</sub>O:ácido fórmico (4:4:1) dos veces. El eluato recuperado (aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ ) se secó mediante una bomba de vacío. La muestra secada se redisolvió en 20  $\mu\text{L}$  de TFA al 0,095%-acetonitrilo al 5% bajo la acción de ultrasonidos (160 W), y se aplicó a una punta C18 (PerfectPure C18 Tip, Eppendorf) para adsorción, y la punta se lavó con TFA al 0,1%. Los péptidos fueron eluidos con 2  $\mu\text{L}$  de TFA al 0,1%-acetonitrilo al 50%, se transfirieron sobre la placa diana para espectrometría de masas, y se secaron. A continuación, se aplicó por goteo 1  $\mu\text{L}$  de disolución matriz, es decir, 0,3 mg/mL de CHCA en etanol: acetona (2:1) sobre la muestra secada, y la placa diana se volvió a secar.

Se usó un instrumento MALDI-TOF-MS, AXIMA CFR, para la espectrometría de masas. Las mediciones se realizaron en modo lineal. Como cada muestra de suero contenía 200 fmol del patrón interno, se pudo calcular el número de fmoles en cada muestra multiplicando la relación de intensidades de la muestra respecto al patrón interno por 200.

La Figura 3 muestra los resultados del ensayo de inmunoMS para 2 controles sanos (NR), 5 pacientes de hígado graso (FL) y 13 pacientes de NASH (NS). Se muestra la media y la desviación estándar (barras) correspondiente a determinaciones por duplicado o triplicado para cada muestra. Las IDs que son idénticas a las del Ejemplo 2 están indicadas para FL y NS pero las de CH no se corresponden. El valor umbral de 8,3 fmol/ $\mu\text{L}$  para la concentración en suero del péptido glicado está indicado mediante una línea punteada. Se observó que el número de casos que exceden el umbral/número total de casos era de 0/2 para los controles sanos, 1/5 para los pacientes de hígado graso y 11/13 para los pacientes de NASH. Obviamente, los valores fueron elevados en los pacientes de NASH. La media y la desviación estándar de la concentración en suero (fmol/ $\mu\text{L}$ ) fueron las siguientes (número de sujetos entre paréntesis): controles sanos, 1,75, 2,47 (2); pacientes de hígado graso, 6,36, 5,18 (5); pacientes de NASH, 17,10, 9,11 (13); pacientes de hepatitis crónica, 17,93, 13,82 (2).

La Figura 4 es un diagrama de dispersión de los resultados de hígado graso y NASH mostrados en la Figura 3. Los respectivos valores medios son 6,36 fmol/ $\mu\text{mol}$  y 17,10 fmol/ $\mu\text{L}$  tal como se ha descrito antes. El hecho de que el valor p del ensayo-t sea 0,026 indica que los pacientes con NASH tienen una concentración en suero significativamente más alta de péptido parcial glicado (Secuencia N° 3) de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina que los pacientes de hígado graso.

La Figura 5 muestra la capacidad de la diagnosis diferencial entre hígado graso y NASH en términos de las curvas de Características Operativas del Receptor (ROC, del inglés "Receiver Operating Characteristics") y la correspondiente área bajo la curva (AUC, del inglés "Area under the Curve"). La AUC es 0,862, lo que indica que el péptido parcial glicado de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina es un marcador diagnóstico útil que diferencia entre hígado graso y NASH. Cabe destacar que en la Figura 5 el péptido parcial glicado (Secuencia N° 3) de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina se expresa como un péptido p35.

Ejemplo 5. Construcción de ELISA para la determinación del fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

Se construye un método tipo sándwich en el que el antígeno es interpuesto entre dos anticuerpos que tienen diferentes epítomos unidos a ambos extremos del mismo. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. En la presente memoria se describe el caso de anticuerpos policlonales.

En el Ejemplo 3 (Figura 2) se muestra que el anticuerpo, BMPEP1117R, reacciona con el extremo N del fragmento de proteína de 35 kDa (Secuencia N° 2) de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina. Para confirmar adicionalmente que el BMPEP1117R captura este fragmento y que el fragmento capturado de este modo reacciona con un anticuerpo específico del extremo C del fragmento de proteína de 35 kDa (Secuencia N° 2), se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

Se preparó un anticuerpo específico del extremo C (denominado en la presente memoria BMPEP1117C), según el método descrito en el Ejemplo 1, usando el péptido parcial SATRERRLDYQEGPPGVEIS (217-236) de la Secuencia N° 2 como inmunógeno. El anticuerpo se obtuvo como la fracción IgG a partir de antisuero. El anticuerpo se reticuló con Sepharose de Proteína G usando dimetil pimelimidato (DMP) para producir "partículas de anticuerpo". Se

llevaron a cabo experimentos para ver si el BMPEP1117R captura el fragmento de proteína de 35 kDa usando dichas partículas de anticuerpo, que fueron almacenadas en la forma de una suspensión preparada añadiendo 2 volúmenes de TBS por volumen de partículas húmedas.

- 5 Muestras de suero de treinta y cinco microlitros cada una procedentes de 3 pacientes con hepatitis crónica, en los que la presencia del fragmento de proteína de 35 kDa de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, fueron mezcladas con 1 mL de TBS y se añadió la suspensión almacenada de partículas de anticuerpo (30  $\mu$ L). La mezcla resultante se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 2 h y se transfirió a una columna de giro. Las partículas de anticuerpo fueron lavadas varias veces con TBS mediante centrifugación y, finalmente, se el fragmento de proteína capturado por las partículas de anticuerpo fue eluido con 100  $\mu$ L de glicina-HCl 0,2 M (pH 2,5) 10 dos veces. Se neutralizó un total de 200  $\mu$ L de sobrenadante con Tris 1 M y se concentró hasta un volumen de 40  $\mu$ L usando microcon 10 (MILLIPORE) mediante centrifugación repetida durante lo cual se cambió el disolvente por tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0). El concentrado resultante se sometió a SDS-PAGE con gel de acril amida al 10% y se llevó a cabo un ensayo de transferencia Western usando BMPEP1117C (1:1000) como anticuerpo primario e IgG anti-conejo conjugada a HRP (1:5000) (GE Healthcare) como anticuerpo secundario.
- 15 La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de transferencia Western descrito anteriormente. En todas las muestras procedentes de los 3 pacientes con hepatitis crónica evaluados, se observaron varias bandas en el entorno de 35 kDa y sus localizaciones coincidieron con las de la Figura 2. Estos resultados demuestran que el BMPEP1117R captura el fragmento de proteína de 35 kDa (Secuencia N° 2) del precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina y que el fragmento así capturado reacciona con el anticuerpo específico de su extremo 20 C. Por lo tanto, se demuestra que se ha conseguido la construcción de un ELISA para la medida del fragmento de proteína de 35 kDa (Secuencia N° 2) de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.

#### **Aplicabilidad industrial**

- 25 Puesto que la enfermedad de hígado graso no alcohólico, que incluye la esteatohepatitis no alcohólica, se puede detectar usando los biomarcadores descritos en la presente invención, la invención es aplicable al uso en el campo de la diagnosis médica, que incluye los agentes diagnósticos.

**Listado de secuencias**

<110> MCBI Inc.

5 <120> Biomarcador en NASH

<130> 08P01006

<160> 3

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 930

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Pro Pro Arg Pro Val Arg Thr Cys Ser Lys Val Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Ala Ile His Gln Thr Thr Thr Ala Glu Lys Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Ile Tyr Ser Leu Thr Val Asp Ser Arg Val Ser Ser Arg Phe  
 35 40 45

Ala His Thr Val Val Thr Ser Arg Val Val Asn Arg Ala Asn Thr Val  
 50 55 60

Gln Glu Ala Thr Phe Gln Met Glu Leu Pro Lys Lys Ala Phe Ile Thr  
 65 70 75 80

Asn Phe Ser Met Asn Ile Asp Gly Met Thr Tyr Pro Gly Ile Ile Lys  
 85 90 95

Glu Lys Ala Glu Ala Gln Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Val Ala Lys Gly  
 100 105 110

Lys Ser Ala Gly Leu Val Lys Ala Thr Gly Arg Asn Met Glu Gln Phe  
 115 120 125

Gln Val Ser Val Ser Val Ala Pro Asn Ala Lys Ile Thr Phe Glu Leu  
 130 135 140

Val Tyr Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Leu Gly Val Tyr Glu Leu Leu  
 145 150 155 160

Leu Lys Val Arg Pro Gln Gln Leu Val Lys His Leu Gln Met Asp Ile  
 165 170 175

20

ES 2 535 971 T3

His Ile Phe Glu Pro Gln Gly Ile Ser Phe Leu Glu Thr Glu Ser Thr  
 180 185 190

Phe Met Thr Asn Gln Leu Val Asp Ala Leu Thr Thr Trp Gln Asn Lys  
 195 200 205

Thr Lys Ala His Ile Arg Phe Lys Pro Thr Leu Ser Gln Gln Gln Lys  
 210 215 220

Ser Pro Glu Gln Gln Glu Thr Val Leu Asp Gly Asn Leu Ile Ile Arg  
 225 230 235 240

Tyr Asp Val Asp Arg Ala Ile Ser Gly Gly Ser Ile Gln Ile Glu Asn  
 245 250 255

Gly Tyr Phe Val His Tyr Phe Ala Pro Glu Gly Leu Thr Thr Met Pro  
 260 265 270

Lys Asn Val Val Phe Val Ile Asp Lys Ser Gly Ser Met Ser Gly Arg  
 275 280 285

Lys Ile Gln Gln Thr Arg Glu Ala Leu Ile Lys Ile Leu Asp Asp Leu  
 290 295 300

Ser Pro Arg Asp Gln Phe Asn Leu Ile Val Phe Ser Thr Glu Ala Thr  
 305 310 315 320

Gln Trp Arg Pro Ser Leu Val Pro Ala Ser Ala Glu Asn Val Asn Lys  
 325 330 335

Ala Arg Ser Phe Ala Ala Gly Ile Gln Ala Leu Gly Gly Thr Asn Ile  
 340 345 350

Asn Asp Ala Met Leu Met Ala Val Gln Leu Leu Asp Ser Ser Asn Gln  
 355 360 365

Glu Glu Arg Leu Pro Glu Gly Ser Val Ser Leu Ile Ile Leu Leu Thr  
 370 375 380

Asp Gly Asp Pro Thr Val Gly Glu Thr Asn Pro Arg Ser Ile Gln Asn  
 385 390 395 400

Asn Val Arg Glu Ala Val Ser Gly Arg Tyr Ser Leu Phe Cys Leu Gly  
 405 410 415

ES 2 535 971 T3

Phe Gly Phe Asp Val Ser Tyr Ala Phe Leu Glu Lys Leu Ala Leu Asp  
 420 425 430

Asn Gly Gly Leu Ala Arg Arg Ile His Glu Asp Ser Asp Ser Ala Leu  
 435 440 445

Gln Leu Gln Asp Phe Tyr Gln Glu Val Ala Asn Pro Leu Leu Thr Ala  
 450 455 460

Val Thr Phe Glu Tyr Pro Ser Asn Ala Val Glu Glu Val Thr Gln Asn  
 465 470 475 480

Asn Phe Arg Leu Leu Phe Lys Gly Ser Glu Met Val Val Ala Gly Lys  
 485 490 495

Leu Gln Asp Arg Gly Pro Asp Val Leu Thr Ala Thr Val Ser Gly Lys  
 500 505 510

Leu Pro Thr Gln Asn Ile Thr Phe Gln Thr Glu Ser Ser Val Ala Glu  
 515 520 525

Gln Glu Ala Glu Phe Gln Ser Pro Lys Tyr Ile Phe His Asn Phe Met  
 530 535 540

Glu Arg Leu Trp Ala Tyr Leu Thr Ile Gln Gln Leu Leu Glu Gln Thr  
 545 550 555 560

Val Ser Ala Ser Asp Ala Asp Gln Gln Ala Leu Arg Asn Gln Ala Leu  
 565 570 575

Asn Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Phe Val Thr Pro Leu Thr Ser Met Val  
 580 585 590

Val Thr Lys Pro Asp Asp Gln Glu Gln Ser Gln Val Ala Glu Lys Pro  
 595 600 605

Met Glu Gly Glu Ser Arg Asn Arg Asn Val His Ser Gly Ser Thr Phe  
 610 615 620

Phe Lys Tyr Tyr Leu Gln Gly Ala Lys Ile Pro Lys Pro Glu Ala Ser  
 625 630 635 640

Phe Ser Pro Arg Arg Gly Trp Asn Arg Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ser  
 645 650 655

ES 2 535 971 T3

Arg Met Asn Phe Arg Pro Gly Val Leu Ser Ser Arg Leu Leu Gly Leu  
660 665 670

Pro Gly Pro Pro Asp Val Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro Phe Arg  
675 680 685

Arg Leu Ala Ile Leu Pro Ala Ser Ala Pro Pro Ala Thr Ser Asn Pro  
690 695 700

Asp Pro Ala Val Ser Arg Val Met Asn Ile Lys Ile Glu Glu Thr Thr  
705 710 715 720

Met Thr Thr Gln Thr Pro Ala Pro Ile Gln Ala Pro Ser Ala Ile Leu  
725 730 735

Pro Leu Pro Gly Gln Ser Val Glu Arg Leu Cys Val Asp Pro Arg His  
740 745 750

Arg Gln Gly Pro Val Asn Leu Leu Ser Asp Pro Glu Gln Gly Val Glu  
755 760 765

Val Thr Gly Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala Gly Phe Ser Trp Ile Glu  
770 775 780

Val Thr Phe Lys Asn Pro Leu Val Trp Val His Ala Ser Pro Glu His  
785 790 795 800

Val Val Val Thr Arg Asn Arg Arg Ser Ser Ala Tyr Lys Trp Lys Glu  
805 810 815

Thr Leu Phe Ser Val Met Pro Gly Leu Lys Met Thr Met Asp Lys Thr  
820 825 830

Gly Leu Leu Leu Leu Ser Asp Pro Asp Lys Val Thr Ile Gly Leu Leu  
835 840 845

Phe Trp Asp Gly Arg Gly Glu Gly Leu Arg Leu Leu Leu Arg Asp Thr  
850 855 860

Asp Arg Phe Ser Ser His Val Gly Gly Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln  
865 870 875 880

Glu Val Leu Trp Gly Ser Pro Ala Ala Ser Asp Asp Gly Arg Arg Thr  
885 890 895

Leu Arg Val Gln Gly Asn Asp His Ser Ala Thr Arg Glu Arg Arg Leu  
900 905 910

Asp Tyr Gln Glu Gly Pro Pro Gly Val Glu Ile Ser Cys Trp Ser Val  
915 920 925

Glu Leu  
930

5 <210> 2  
<211> 242

ES 2 535 971 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

5  
 Arg Leu Ala Ile Leu Pro Ala Ser Ala Pro Pro Ala Thr Ser Asn Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Ala Val Ser Arg Val Met Asn Ile Lys Ile Glu Glu Thr Thr  
 20 25 30  
 Met Thr Thr Gln Thr Pro Ala Pro Ile Gln Ala Pro Ser Ala Ile Leu  
 35 40 45  
 Pro Leu Pro Gly Gln Ser Val Glu Arg Leu Cys Val Asp Pro Arg His  
 50 55 60  
 Arg Gln Gly Pro Val Asn Leu Leu Ser Asp Pro Glu Gln Gly Val Glu  
 65 70 75 80  
 Val Thr Gly Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala Gly Phe Ser Trp Ile Glu  
 85 90 95  
 Val Thr Phe Lys Asn Pro Leu Val Trp Val His Ala Ser Pro Glu His  
 100 105 110  
 Val Val Val Thr Arg Asn Arg Arg Ser Ser Ala Tyr Lys Trp Lys Glu  
 115 120 125  
 Thr Leu Phe Ser Val Met Pro Gly Leu Lys Met Thr Met Asp Lys Thr  
 130 135 140  
 Gly Leu Leu Leu Leu Ser Asp Pro Asp Lys Val Thr Ile Gly Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Phe Trp Asp Gly Arg Gly Glu Gly Leu Arg Leu Leu Leu Arg Asp Thr  
 165 170 175  
 Asp Arg Phe Ser Ser His Val Gly Gly Thr Leu Gly Gln Phe Tyr Gln  
 180 185 190  
 Glu Val Leu Trp Gly Ser Pro Ala Ala Ser Asp Asp Gly Arg Arg Thr  
 195 200 205  
 Leu Arg Val Gln Gly Asn Asp His Ser Ala Thr Arg Glu Arg Arg Leu  
 210 215 220  
 Asp Tyr Gln Glu Gly Pro Pro Gly Val Glu Ile Ser Cys Trp Ser Val  
 225 230 235 240  
 Glu Leu

10 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> MOD\_RES

ES 2 535 971 T3

<222> (8)..(8)  
<223> O-glicosilación

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> O-glicosilación

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> O-glicosilación

15 <400> 3  
Arg Leu Ala Ile Leu Pro Ala Ser Ala Pro Pro Ala Thr Ser Asn Pro  
1 5 10 15

Asp

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** El uso de un biomarcador para la detección *in vitro* de una enfermedad de hígado graso no alcohólico, donde dicho biomarcador comprende al menos una proteína o péptido seleccionado del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.
- 10 **2.** El uso de un biomarcador para la detección *in vitro* de una esteatohepatitis no alcohólica que comprende al menos una proteína o péptido seleccionado del grupo que consiste en precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 1, el fragmento de proteína de 35 kDa que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 2 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, y el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos expresada por la Secuencia N° 3 de precursor de cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina.
- 15 **3.** Un método para la detección de enfermedad de hígado graso no alcohólico que implica la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en la Reivindicación 1.
- 4.** Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica que implica la determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la esteatohepatitis no alcohólica descrito en la Reivindicación 2.
- 20 **5.** Un método para la detección de enfermedad de hígado graso no alcohólico en el cual se determina que el paciente padece la enfermedad de hígado graso no alcohólico cuando, tras determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en la Reivindicación 1, se observa que dicho biomarcador está presente en una cantidad superior a la de los controles normales.
- 25 **6.** Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica en el cual se determina que el paciente padece la enfermedad de esteatohepatitis no alcohólica cuando, tras determinación en un material biológico de al menos un biomarcador para la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en la Reivindicación 2, se observa que dicho biomarcador está presente en una cantidad superior a la de los controles normales.
- 30 **7.** Un método para la detección de la enfermedad de hígado graso no alcohólico descrito en la Reivindicación 3 ó en la Reivindicación 5, donde la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotinción, un ensayo de transferencia Western, un método de anticuerpo marcado con enzima, fluorescencia o radioisótopo, espectrometría de masas, método inmunoMS o método de resonancia de plasmón superficial.
- 8.** Un método para la detección de esteatohepatitis no alcohólica descrito en la Reivindicación 4 ó en la Reivindicación 6, donde la detección se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunotinción, un ensayo de transferencia Western, un método de anticuerpo marcado con enzima, fluorescencia o radioisótopo, espectrometría de masas, método inmunoMS o método de resonancia de plasmón superficial.
- 35 **9.** El uso de un kit en la detección *in vitro* de una enfermedad de hígado graso no alcohólico para determinar al menos un biomarcador descrito en la Reivindicación 1, conteniendo dicho kit un anticuerpo o un aptámero de al menos un biomarcador descrito en la Reivindicación 1.
- 40 **10.** El uso de un kit en la detección *in vitro* de esteatohepatitis no alcohólica para determinar al menos un biomarcador descrito en la Reivindicación 2, conteniendo dicho kit un anticuerpo o un aptámero de al menos un biomarcador descrito en la Reivindicación 2.
- 11.** El uso de un kit en la detección *in vitro* según la Reivindicación 9 ó la Reivindicación 10, donde dicho anticuerpo o aptámero está solidificado sobre una placa o placas.

Figura 1

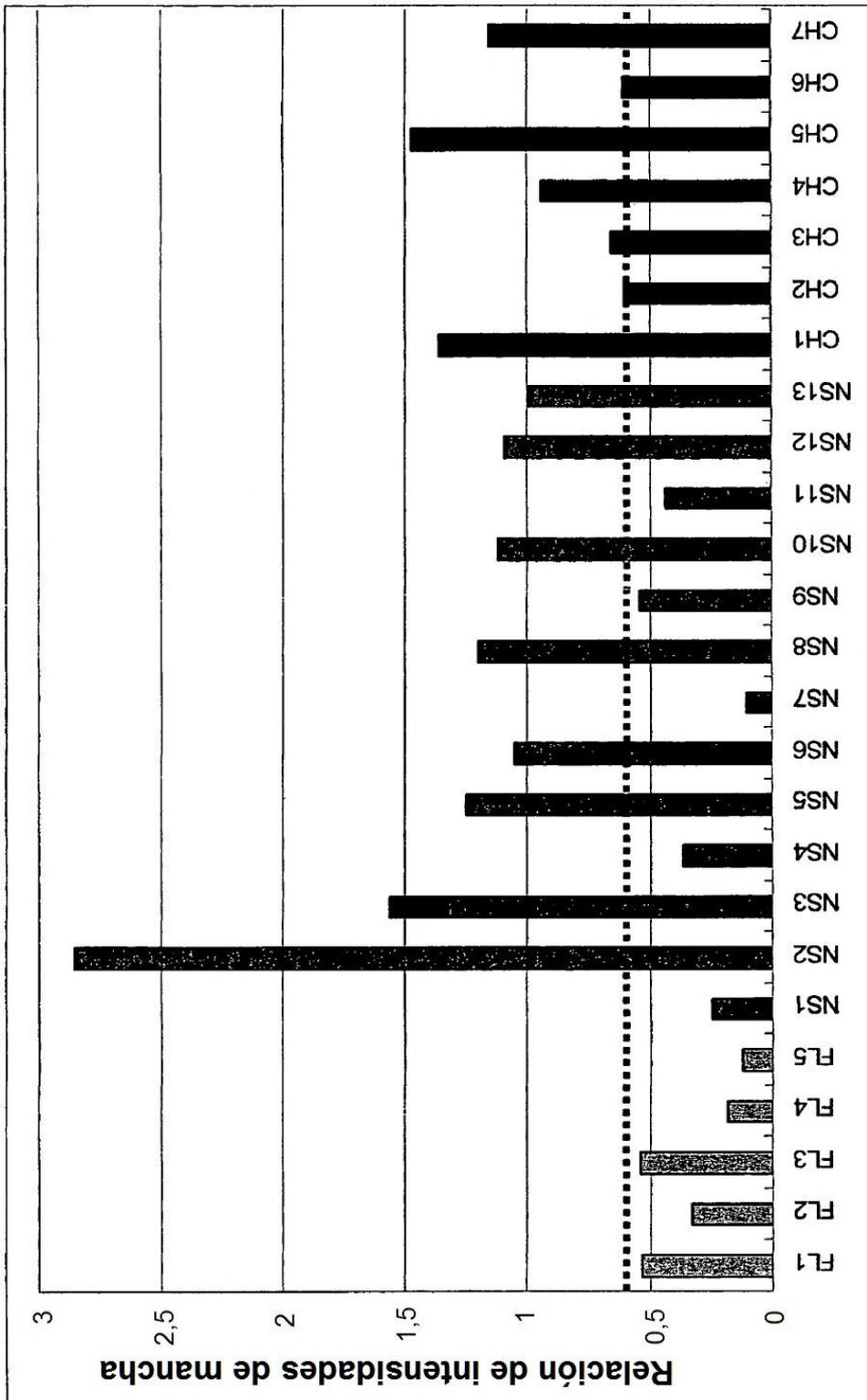


Figura 2

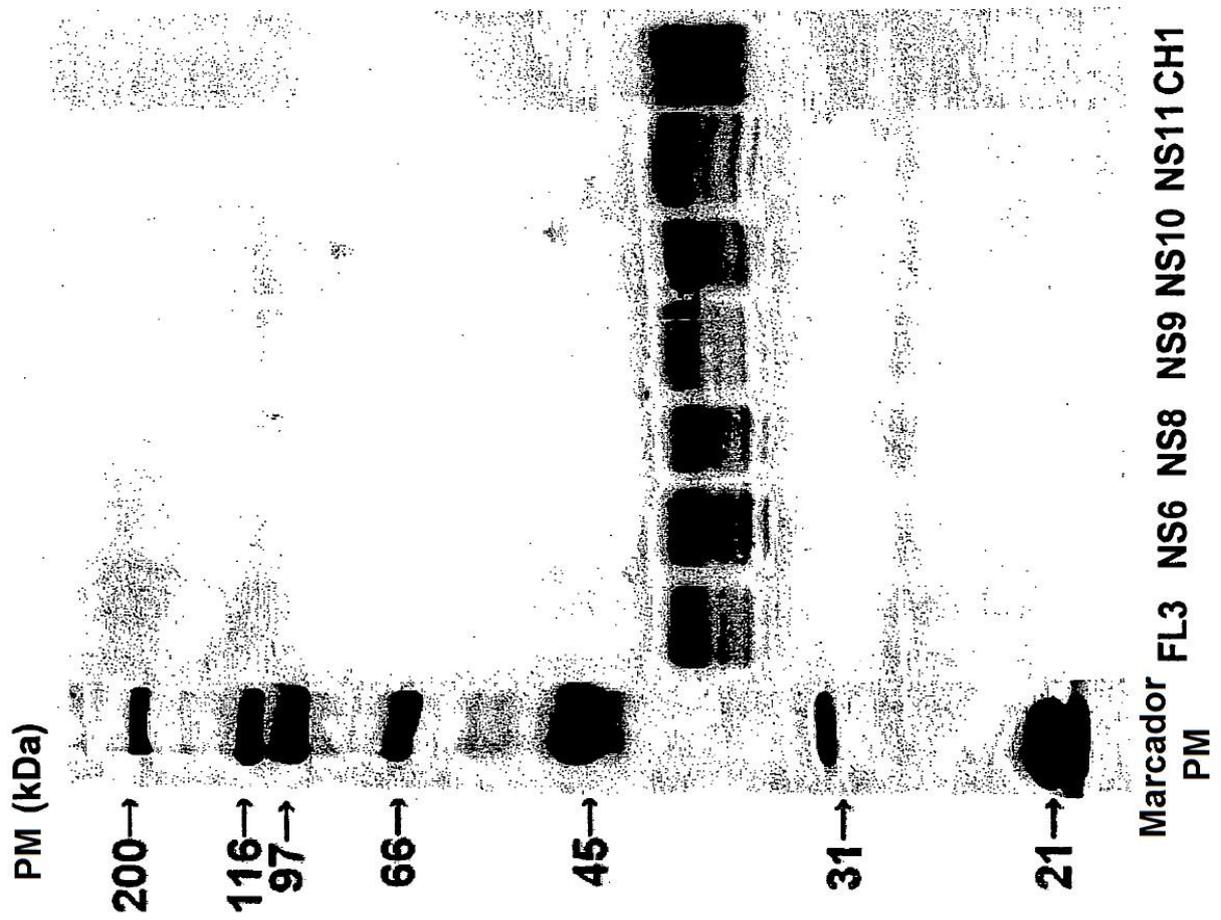


Figura 3

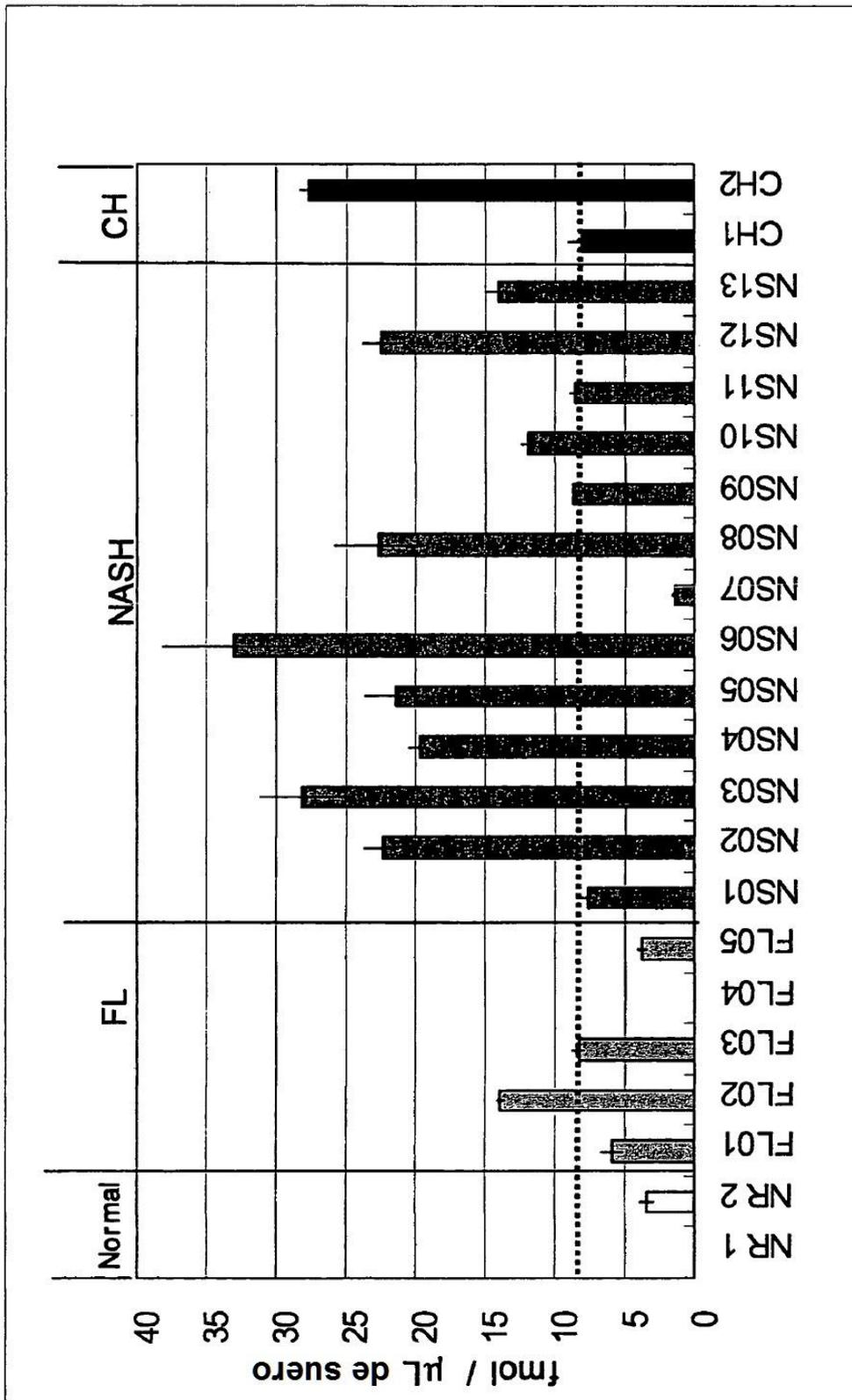


Figura 4

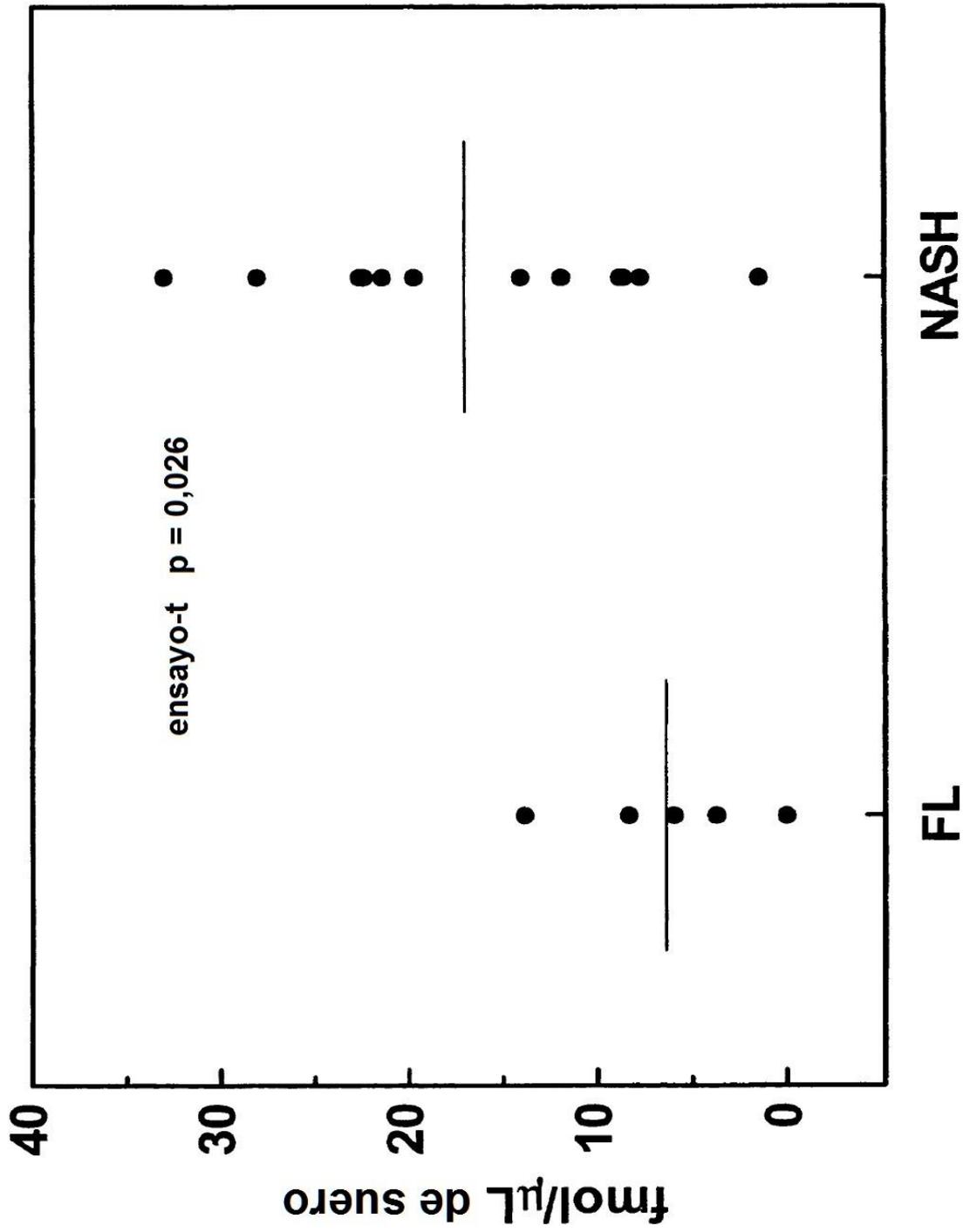


Figura 5

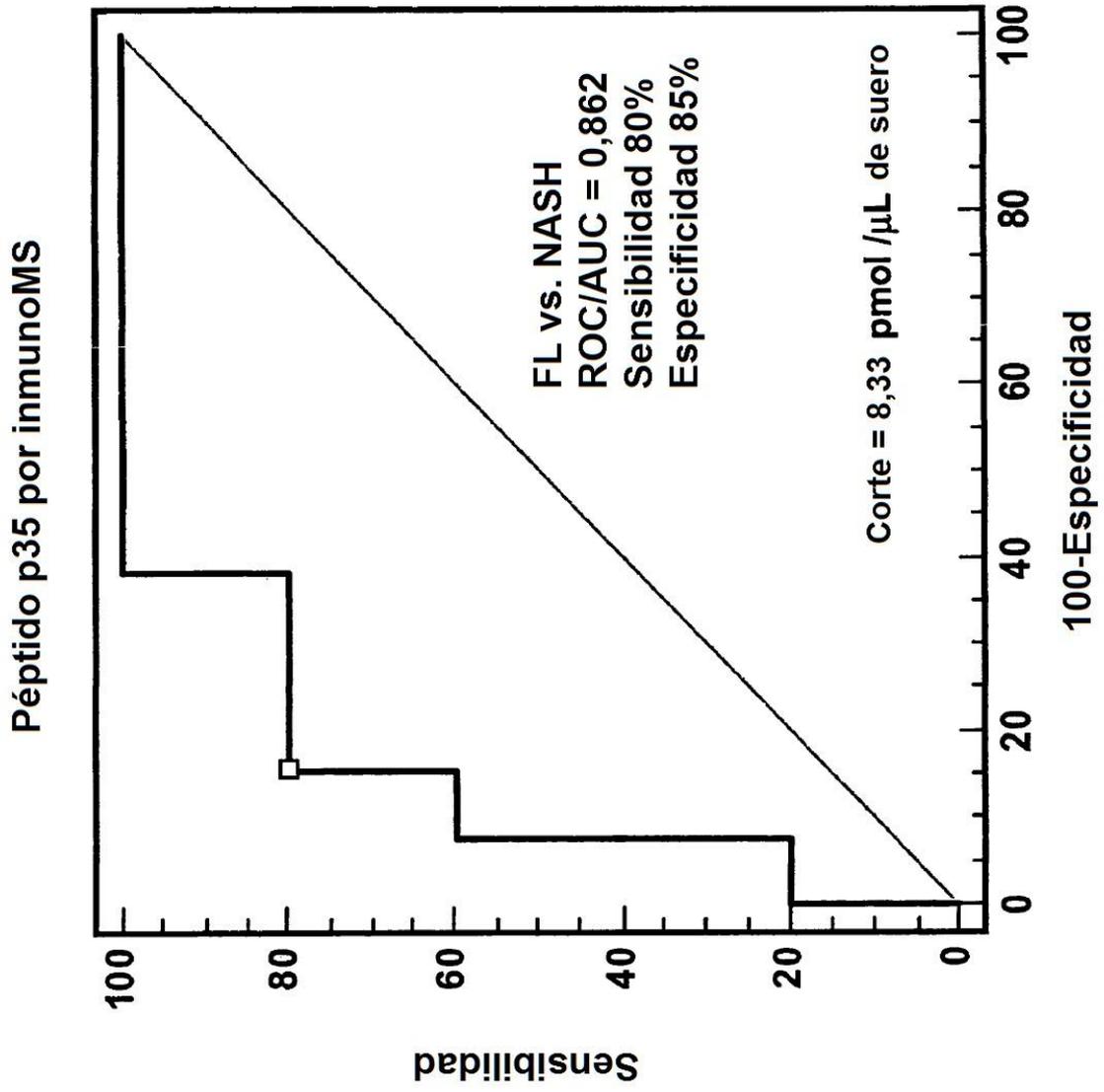


Figura 6

