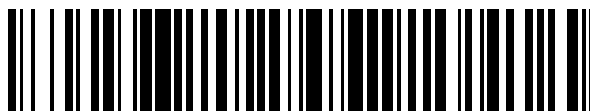


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 838**

51 Int. Cl.:

G06F 19/00 (2011.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2009** **PCT/IB2009/007719**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010** **WO10058295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2009** **E 09796060 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2359285**

54 Título: **Método in vitro no invasivo para la cuantificación de lesiones hepáticas**

30 Prioridad:

18.11.2008 US 115677 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITE D'ANGERS (50.0%)
40, rue de Rennes
49035 Angers Cedex 01 , FR y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
D'ANGERS (50.0%)

72 Inventor/es:

CALES, PAUL y
AUBE, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 621 838 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* no invasivo para la cuantificación de lesiones hepáticas

Esta invención se refiere al campo del diagnóstico hepático y más precisamente a un método no invasivo *in vitro* para cuantificar lesiones hepáticas, especialmente debidas o relacionadas con insuficiencia hepática, esteatosis hepática, enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD), o esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En el sentido de esta invención se entiende por cuantificación la determinación de la cantidad y/o la arquitectura de las lesiones hepáticas.

La FLD (enfermedad del hígado graso) describe una amplia gama de afecciones potencialmente reversibles que implican el hígado, en donde se acumulan grandes vacuolas de grasa de triglicéridos en hepatocitos a través del proceso de esteatosis (esto es, la retención anormal de lípidos dentro de una célula).

La FLD se asocia comúnmente con alcohol o síndromes metabólicos (diabetes, hipertensión, dislipidemia, betalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Weber-Christian, enfermedad de Wolman, hígado graso agudo del embarazo, lipodistrofia). Sin embargo, también puede deberse a causas nutricionales (desnutrición, nutrición parenteral total, pérdida severa de peso, síndrome de realimentación, bypass yeyuno ileal, bypass gástrico, diverticulosis yeyunal con sobrecrecimiento bacteriano), así como diversos fármacos y toxinas (amiodarona, metotrexato, diltiazem, terapia antirretroviral altamente activa, glucocorticoides, tamoxifeno, hepatotoxinas ambientales) y otras enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria intestinal o HIV.

Ya sea AFLD (enfermedad por hígado graso alcohólico) o NAFLD (enfermedad por hígado graso no alcohólico), la FLD abarca un espectro morfológico que consiste del tipo más leve de esteatosis hepática (hígado graso), denominado NAFLD, al tipo potencialmente más grave "esteatohepatitis", denominado NASH, que se asocia con la inflamación dañina del hígado y, a veces, la formación de tejido fibroso. De hecho, la esteatohepatitis tiene la propensión inherente a progresar hacia el desarrollo de la fibrosis luego cirrosis que puede producir cicatrices hepáticas progresivas e irreversibles o hacia el carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado).

Debido a que estas enfermedades pueden ser potencialmente invertidas si se diagnostican con tiempo suficiente, o al menos sus consecuencias limitadas, es crucial poder proporcionar al campo médico herramientas que permitan un diagnóstico precoz, rápido y preciso.

Durante mucho tiempo, el diagnóstico de esteatosis hepática se ha llevado a cabo habitualmente midiendo marcadores tales como g-glutamyltranspeptidasa (GGT) y alanina aminotransferasa (ALT) mientras que al mismo tiempo realiza una biopsia de hígado con el fin de confirmar FLD y determinar la clasificación y estadificación de la enfermedad. Aunque las biopsias pueden proporcionar información importante sobre el grado de daño hepático, en particular la gravedad de la actividad necroinflamatoria, la fibrosis y la esteatosis, el procedimiento también presenta varias limitaciones, tales como el error de muestreo, la invasividad, el costo, el dolor para los pacientes, lo que a su vez provoca cierta renuencia a someterse a dicho procedimiento; y finalmente las complicaciones pueden surgir de tal procedimiento, que en algunos casos puede incluso conducir a la mortalidad. La ecografía también se utiliza para diagnosticar esteatosis hepática. Sin embargo, este método es subjetivo ya que se basa en la intensidad del eco (ecogenicidad) y patrones especiales de ecos (textura). Como resultado, no es lo suficientemente sensible y a menudo inexacta en pacientes con fibrosis avanzada. Por último, se admite generalmente que alrededor de la mitad de todos los casos de FLD son detectados por las pruebas de sangre habituales y alrededor de la mitad por ecografía, lo que resulta en alrededor de una cuarta parte del diagnóstico erróneo cuando ambos se utilizan.

En los últimos años, el uso de biomarcadores no invasivos ha ganado importancia en el campo del diagnóstico hepático. De hecho, varias pruebas utilizando biomarcadores no invasivos ya se han desarrollado y propuesto para el diagnóstico de fibrosis (véase, por ejemplo, WO 2005/116901). El ensayo se refiere a un método para diagnosticar la presencia y/o gravedad de una patología hepática y/o para controlar la efectividad de un tratamiento curativo contra una patología hepática en un individuo, estableciendo al menos una puntuación diagnóstica no invasiva, en particular una puntuación diagnóstica para la fibrosis portal y septal y/o una estimación de la cantidad de fibrosis (el área de fibrosis) y/o una estimación de la arquitectura de la fibrosis (dimensión fractal).

Recientemente, Poynard et al. (WO 2006/082522) han demostrado que un único o un panel de biomarcadores puede ser utilizado como una alternativa a la biopsia de hígado para el diagnóstico de esteatosis, ya sea inducida por alcohol, hepatitis viral o NAFLD, las causas más comunes de esteatosis. En particular, este documento proporciona un nuevo panel de biomarcadores conocidos como SteatoTest (ST) con valores predictivos para el diagnóstico de esteatosis debido al alcohol, NAFLD y hepatitis C y B. Suero GGT y ALT fueron considerados como los marcadores bioquímicos estándar. De acuerdo con the French National Agency for Health (HAS), actualizada en diciembre de 2008, y la opinión internacional actual, la realización de este tipo de prueba puede ser insuficiente, especialmente debido a la referencia basada en una clasificación subjetiva de esteatosis hepática con una reproducibilidad pobre del inter-observador. Además, esta clasificación es una variable semicuantitativa que implica una reflexión imprecisa y limitada del patrón original.

- Watkins et al. (WO 2008/021192) ha proporcionado métodos para evaluar el nivel de triglicéridos en el hígado de un sujeto. Tales métodos comprenden determinar la cantidad de metabolitos lipídicos en una muestra recogida de un fluido corporal del sujeto y compararlo con un valor de referencia que representa el nivel normal de los metabolitos lipídicos, o correlacionar la cantidad con la presencia de un trastorno hepático. Se dice que los métodos se usan, por ejemplo, para el diagnóstico y control de trastornos hepáticos tales como esteatosis, NAFLD y NASH (Esteatohepatitis no alcohólica). De este modo, con el fin de predecir la esteatosis, Watkins sólo utiliza un tipo de biomarcadores (esto es, lípidos metabólicos) en un líquido corporal al azar. Sin embargo, el uso de este tipo de biomarcadores tiene varias limitaciones. En primer lugar, se ha demostrado que el nivel sérico de triglicéridos no siempre fue un marcador independiente de esteatosis hepática. En segundo lugar, los procesos patológicos son procesos de múltiples etapas y una estrategia dirigida a biomarcadores puede perder una o varias etapas que son relevantes para un diagnóstico preciso. Finalmente, un fluido corporal es el resultado de mezclar fuentes de todo el metabolismo que puede introducir algunos sesgos resultantes de cambios debidos a otros órganos que el órgano diana para el diagnóstico. Por último, el contenido de triglicéridos (medición bioquímica) es un objetivo de diagnóstico diferente en comparación con la esteatosis hepática (lesión histológica, esto es, imagen anormal)
- El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos métodos no invasivos utilizando biomarcadores mixtos de diferentes fuentes, que evitan las limitaciones antes mencionadas y son más precisos y fiables que los métodos citados en la técnica anterior, como se muestra por su alto rendimiento de diagnóstico. Los métodos de la invención reducen considerablemente la necesidad de biopsias, ya que capturan más información que en la técnica anterior sobre las lesiones evaluadas, garantizan la reproducibilidad y el rendimiento, mientras que atenúan las causas de falsos resultados (en general, las fuentes de resultados falsos se antagonizan en una puntuación incluyendo varios marcadores siempre que se incluyan algunas precauciones).
- El solicitante ha observado ahora que, en el hígado, las tres lesiones, fibrosis, esteatosis e inflamación (NASH) están profundamente interconectadas. Por ejemplo, el grado de esteatosis hepática es un factor predictivo de la NASH en pacientes con NAFLD; también, fibrosis significativa se asocia con el desarrollo de esteatosis y NASH en NAFLD.
- El solicitante también observó que, como una enfermedad hepática se debe a la causa, dando lugar a lesiones, dichas lesiones induciendo síntomas y terminando en complicaciones, la información más fiable para el paciente fue el grado de sus lesiones hepáticas.
- El solicitante demuestra en este documento que las lesiones están relacionadas: existe una relación entre lesiones.
- La fibrosis se puede cuantificar mediante la determinación de una puntuación (fase reflectante), área de fibrosis (cantidad reflectante) o dimensión fractal (arquitectura reflectante).
- La esteatosis se puede cuantificar por determinación de una puntuación, área de fibrosis o dimensión fractal.
- La NASH se puede evaluar mediante la determinación de la(s) puntuación(es).
- La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Esta invención se refiere de este modo a un método *in vitro* para cuantificar las lesiones de un paciente, preferiblemente con NAFLD, que comprende dirigir un objetivo de diagnóstico, esto es, cuantificar fibrosis, esteatosis y/o NASH por
- realizar una puntuación, un área o una dimensión fractal de fibrosis en dicho paciente y/o
 - realizar una puntuación, un área o una dimensión fractal de esteatosis en dicho paciente y/o
 - realizar una puntuación de esteatohepatitis (NASH) en dicho paciente
- mediante
- medición de al menos un marcador, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 marcadores seleccionados del grupo que consiste en biomarcadores y posiblemente marcadores clínicos y posiblemente puntuaciones, seleccionándose los biomarcadores del grupo que consiste en glucemia, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), AST/ALT, AST.ALT, ferritina, plaquetas, índice de protrombina, ácido hialurónico, hemoglobina, triglicéridos, seleccionándose el biomarcador clínico del grupo que consiste en peso, índice de masa corporal, sexo y edad, y seleccionándose las puntuaciones del grupo que consiste de puntuación de fibrosis, área de fibrosis, dimensión fractal de fibrosis, puntuación de esteatosis, área de esteatosis, dimensión fractal de esteatosis;
 - y combinación de dichas medidas en una función matemática que incluye dichos marcadores con el fin de obtener un valor final.
- En la última etapa, la combinación se obtiene implementando el método estadístico que implica una función matemática denominada regresión logística binaria (u ordinal) o regresión lineal múltiple con el siguiente procedimiento:

- en primer lugar, las variables independientes se prueban mediante análisis univariado;

- en segundo lugar, las variables independientes que fueron significativas en el análisis univariado se prueban en análisis multivariable mediante regresión logística binaria (u ordinal) o regresión lineal múltiple con la etapa ascendente o descendente mediante la selección en etapas; la selección de variables se puede realizar de dos maneras

5 ○ La convencional donde se utiliza la muestra completa de la población de pacientes. Este procedimiento de selección también podría incluir puntuación(es) de otras lesiones que el objetivo de diagnóstico.

10 ○ El método bootstrap donde la función matemática se aplica a diferentes muestras con menos pacientes clasificados por casualidad, usualmente 1000 muestras. Las variables independientes seleccionadas son aquellas con una ocurrencia de mayoría absoluta, esto es, al menos 500 veces entre 1000 muestras. Este método también incluyó sólo variables sin colinealidad significativa (esto significa que las variables están fuertemente vinculadas). Este procedimiento no incluyó puntuación(es) de otras lesiones que el objetivo de diagnóstico. De este modo, esta etapa proporciona un número mínimo de variables predictivas en comparación con la etapa anterior.

- la regresión logística produce la fórmula para cada puntuación en la forma:

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

15

en donde los coeficientes a_i son constantes y las variables x_i son las variables independientes; esta puntuación corresponde al logit de p donde p es la probabilidad de existencia del objetivo de diagnóstico. Esta probabilidad p se calcula con la siguiente fórmula:

$$20 \quad p = \exp(a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots) / (1 + \exp(a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots))$$

o

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

en donde los coeficientes a_i y las variables x_i corresponden a los de la fórmula para la puntuación.

25 Se da abajo el valor de los coeficientes asociados a_i (denominado [beta] en el texto a continuación y con frecuencia en la literatura y B en las tablas siguientes), y las dos últimas columnas dan el intervalo de confianza a_i , esto es, el intervalo de confianza (denominado CI en las tablas a continuación) de los coeficientes beta o la relación odds correspondiente (denominada exp ([beta]) en las tablas).

Cuando el objetivo de diagnóstico es cuantitativo (variable matemática discreta) tal como la medida del área de esteatosis, la función utilizada es una regresión lineal múltiple con área de esteatosis =

$$30 \quad \text{puntuación} = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots$$

En una realización, el objetivo es la fibrosis, y se realiza una puntuación, área y/o dimensión fractal de fibrosis, y se miden al menos 5, preferiblemente 5, 6, 7, 8, marcadores que se seleccionan del grupo que consiste en glucemia, AST, ALT, ferritina, plaquetas, índice de protrombina, ácido hialurónico, hemoglobina, triglicéridos, peso, índice de masa corporal, sexo y edad, preferiblemente glucemia, AST, ALT, ferritina, plaquetas, peso y edad o glucemia, AST, ALT, índice de protrombina, peso.

En otra realización, el objetivo es esteatosis y se realiza una puntuación, área y/o dimensión fractal de esteatosis, y se miden al menos 5 marcadores, siendo dichos marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia, AST, ALT, AST/ALT, AST.ALT ferritina, plaquetas, índice de protrombina, ácido hialurónico, hemoglobina, triglicéridos, peso, índice de masa corporal, sexo y edad, y preferiblemente pero no obligatoria, una puntuación, área o dimensión fractal de fibrosis.

40

En una realización adicional, el objetivo es la esteatohepatitis, y se realiza una puntuación de NASH.

En otra realización, el objetivo de diagnóstico es la fibrosis, y

- se lleva a cabo una puntuación en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferritina y plaquetas o del grupo que consiste en peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferritina e índice de protrombina; o

5 - se lleva a cabo un área en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas e índice de protrombina; o

- se lleva a cabo una dimensión fractal en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en peso, ácido hialurónico, glucemia, AST, edad e índice de protrombina.

En otra realización, el objetivo de diagnóstico es esteatosis y

10 - se lleva a cabo una puntuación en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en glucemia, AST/ALT, triglicéridos, hemoglobina, edad y sexo y opcionalmente al menos una puntuación de fibrosis; o del grupo que consiste en glucemia, AST, triglicéridos, AST/ALT, hemoglobina, BMI y peso y opcionalmente puntuaciones de fibrosis y/o dimensión fractal de la puntuación de fibrosis; o del grupo que consiste en BMI, glucemia y triglicéridos, o del grupo que consiste en BMI, glucemia, triglicéridos y ferritina; o

15 - se lleva a cabo un área en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en glucemia, AST, triglicéridos, BMI, peso y opcionalmente al menos una puntuación de fibrosis; o del grupo que consiste en BMI, glucemia, triglicéridos y ferritina; o

- se lleva a cabo una dimensión fractal en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en glucemia, AST, ALT, triglicéridos, BMI, peso y opcionalmente al menos una puntuación de fibrosis; o del grupo que consiste en BMI, glucemia, triglicéridos y ferritina.

20 En otra realización, el objetivo de diagnóstico es NASH, y los biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en AST, ferritina y AST.ALAT y opcionalmente puntuación de fibrosis y/o puntuación de esteatosis y/o puntuación de NASH; o del grupo que consiste en BMI, AST y ferritina; o ferritina sola.

Puntuación # 1

25 De acuerdo con una primera realización, el objetivo de diagnóstico es una fibrosis significativa determinada por el sistema de puntuación de Metavir implementado por Bedossa et al., y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia, AST, ALT, AST/ALT, ferritina, plaquetas y la medición del peso y edad de los marcadores clínicos, la combinación de dichas medidas mediante una función matemática como se describe anteriormente con el método convencional.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación
Fibrosis significativa	Metavir F $\geq$ 2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferritina, plaquetas	# 1A

30

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables no cambian para esta puntuación.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación
Fibrosis significativa	Metavir F $\geq$ 2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferritina, plaquetas	# 1B

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

35 Puntuación # 2

De acuerdo con una segunda realización, el objetivo de diagnóstico es fibrosis significativa determinada por el sistema NASH-CRN implementado por Kleiner et al., y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia, AST, ALT, ferritina, índice de protrombina y midiendo los marcadores clínicos edad, peso y combinando dichas medidas mediante una función matemática como se describe anteriormente con el método convencional.

40

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación
Fibrosis significativa			
	NASH-CRN F $\geq$ 2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferretina, índice de protrombina	# 2A

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables son menos numerosas para esta puntuación.

Fibrosis significativa			
	NASH-CRN F $\geq$ 2	Peso, glucemia, AST, ALT, índice de protrombina	# 2B

- 5 Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 3

De acuerdo con una tercera realización, el objetivo de diagnóstico es el área de fibrosis, y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas, índice de protrombina y combinando dichas medidas mediante una función matemática como la descrita anteriormente.

10

Objetivo de diagnóstico	Variables independientes	Puntuación
Área de fibrosis	Ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas, índice de protrombina	# 3A

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables no cambian para esta puntuación.

Área de fibrosis	Ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas, índice de protrombina	# 3B
------------------	---	------

- 15 Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 4

De acuerdo con una cuarta realización, el objetivo de diagnóstico es la dimensión fractal de fibrosis, y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en ácido hialurónico, glucemia, AST, índice de protrombina y el marcador clínico de peso, edad, combinando dichos niveles en una función matemática, obtenidos como se describe anteriormente.

20

Objetivo de diagnóstico	Variables independientes	Puntuación
Dimensión fractal de fibrosis	Ácido hialurónico, glucemia, AST, edad, índice de protrombina	# 4A

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se seleccionan con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

Dimensión fractal de fibrosis	Ácido hialurónico, glucemia, AST/ ALT, peso, plaquetas	# 4B
-------------------------------	--	------

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 5

- 5 De acuerdo con una quinta realización, el objetivo de diagnóstico es una esteatosis significativa determinada de acuerdo con un umbral de área de esteatosis ($\geq 3\%$), y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia, AST/ALT, triglicéridos, hemoglobina, edad y sexo y opcionalmente una puntuación como se obtiene de la primera realización (puntuación # 1A) o la segunda (puntuación # 2A) de la presente invención, como se describe anteriormente, y combinando dichos niveles en una función matemática, obtenida como se describe anteriormente.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación
Esteatosis significativa	rAOS $\geq 3\%$	Glucemia, AST/ALT, triglicéridos, hemoglobina, edad, sexo + opcionalmente puntuación 1A y/o puntuación 2A	# 5A

10

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

Esteatosis significativa	rAOS $\geq 3\%$	BMI, glucemia, triglicéridos	# 5B
--------------------------	-----------------	------------------------------	------

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

15 Puntuación # 6

- 20 En la sexta realización, el objetivo de diagnóstico es una esteatosis significativa determinada por NASH-CRN grado ≥ 1 , y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de los biomarcadores seleccionados entre glucemia, AST, triglicéridos, AST/ALT, hemoglobina, los marcadores clínicos se seleccionan del grupo que consiste en BMI y peso, y opcionalmente, uno o más de la puntuación 1, 2 y/o 4 y la combinación de dichos niveles en una función matemática, obtenida como se describe anteriormente.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación
Esteatosis significativa	NASH-CRN grado ≥ 1	Glucemia, AST, triglicéridos, AST/ALT, hemoglobina, BMI, peso + puntuaciones 1A, 2A y 4A	# 6A

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se seleccionan con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

Esteatosis significativa	NASH-CRN grado ≥ 1	BMI, glucemia, triglicéridos, ferretina	# 6B
--------------------------	-------------------------	---	------

25 Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 7

- 30 En la séptima realización, el objetivo de diagnóstico es el área de esteatosis y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia, AST, triglicéridos, ferretina, BMI y peso, y opcionalmente una o más de las puntuaciones 1 y/o 2, combinando dichos niveles en una función matemática, obtenida como se describe anteriormente.

Objetivo de diagnóstico	Variables independientes	Puntuación
Área de esteatosis	Glucemia, AST, triglicéridos, BMI, peso + opcionalmente puntuaciones 1 Y 2	# 7A

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

Área de esteatosis (log)	BMI, Glucemia, triglicéridos, ferretina	# 7B
--------------------------	---	------

5 Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 8

10 En la octava realización, el objetivo de diagnóstico es la dimensión fractal de esteatosis, y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste de glucemia, AST, ALT/ALAT, AST.ALT, ferritina, triglicéridos, BMI, peso, y opcionalmente puntuaciones 1A y 2A y combinando dichos niveles en una función matemática, obtenida como se define en la realización 1 y 2 anteriormente en este documento.

Dimensión fractal de esteatosis	Glucemia, AST, ALT/ALAT, AST.ALT, triglicéridos, BMI, peso + puntuaciones 1A y 2A	# 8
---------------------------------	---	-----

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

Dimensión fractal de esteatosis	BMI, glucemia, triglicéridos, ferretina	# 8B
---------------------------------	---	------

15

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

Puntuación # 9

20 En la novena realización, el objetivo de diagnóstico es NASH de acuerdo con tres definiciones basadas en la puntuación de actividad de NASH (NAS) por Kleiner et al., y el método de la invención se realiza midiendo el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, más preferiblemente todos los marcadores seleccionados del grupo que consiste en AST, ferritina, AST.ALT, BMI y opcionalmente puntuaciones 2A y/o 5A y/o 8A y combinando dichos niveles en una función matemática, obtenida como se describe anteriormente .

NASH	AST, ferretina, AST.ALAT + opcionalmente puntuación 2A, 5A y/u 8A	# 9A
------	---	------

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

25 Cuando se selecciona con el método bootstrap, las variables son las siguientes:

NAS ≥ 3	BMI, AST, ferretina	# 9B
NAS ≥ 5	Ferretina	# 10B
NAS 0-2/3-4/5-7	BMI, AST, ferretina	# 11B

Preferiblemente, los coeficientes de la función matemática son como se describen en los ejemplos.

En el contexto de la presente invención, se deben aplicar las siguientes definiciones:

- La fibrosis se define como una lesión patológica hecha de tejido cicatricial que incluye proteínas fibrilares o glicoproteínas (colágenos, proteoglicanos ...).
- 5 • La puntuación de fibrosis se define como una combinación de marcadores (normalmente vinculados por una función matemática) para los cuales el objetivo de diagnóstico es fibrosis.
- La esteatosis se define como una acumulación de lípidos, usualmente triglicéridos, dentro de vacuolas en las células. Conciérne principalmente de hígado y músculo en el síndrome metabólico.
- El área de esteatosis (AOS) se define como la superficie del hígado ocupada por las vacuolas de esteatosis como se observa en una muestra de hígado observada en dos dimensiones.
- 10 • El área significativa de esteatosis (SAOS) se define como un umbral clínico y estadísticamente significativo de AOS, en el contexto de NAFLD, por ejemplo, más o igual al 3% de la superficie del hígado.
- Clasificación/estadificación de Kleiner: esta es una clasificación patológica dedicada a la NAFLD basada en una descripción morfológica en diferentes clases, ya sea para la esteatosis (denominada convencionalmente como clasificación) o fibrosis (denominada convencionalmente como estadificación). Este sistema semicuantitativo (ordinal en estadística) es la clasificación histológica más reciente y convencional. Este sistema también se conoce como el sistema
- 15 de NASH Clinical Research Network (NASH-CRN).
- Clasificación/estadificación de Metavir: esto es una clasificación patológica dedicada a la hepatitis viral crónica basada en una descripción morfológica en diferentes clases, ya sea para la actividad necro-inflamatoria (convencionalmente denominada como clasificación) o fibrosis (convencionalmente denominada como estadificación). Este sistema semicuantitativo (ordinal en estadística) es la clasificación histológica más utilizada en la hepatitis viral. También se utiliza en otras causas de enfermedades crónicas del hígado tales como el alcohol y la NAFLD.
- 20 • Nivel: la cantidad de un biomarcador particular medida en la sangre o plasma de un paciente, usualmente expresada como una concentración.

El objetivo es la esteatosis

- 25 El solicitante se enfocó especialmente en la "esteatosis" objetivo y encontró que la inclusión de la puntuación de la fibrosis en un método *in vitro* para diagnosticar una afección hepática que implica esteatosis, podría ser de gran interés debido a la interacción entre fibrosis y esteatosis (véase la figura 2 que muestra que la relación entre AOS y estadios de fibrosis explica que la inclusión de la medición no invasiva del estadio de fibrosis aumenta la precisión de la medición no invasiva de AOS)
- 30 De este modo, de acuerdo con una realización, un método de la invención comprende medir el nivel de al menos uno, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 marcador(es) biológico(s) y al menos uno, preferiblemente dos, marcador(es) clínico(s) y opcionalmente, pero preferiblemente, una puntuación de fibrosis, y combinando dichos niveles, medidas y puntuación en una función matemática apropiada.
- De acuerdo con una primera realización, el al menos un marcador biológico se selecciona del grupo que consiste en
- 35 glucemia (GLY), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), AST/ALT, ácido hialurónico (HA), hemoglobina (Hb) y triglicéridos, preferiblemente glucemia (GLY), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), AST/ALT, ácido hialurónico (HA), hemoglobina (Hb) y triglicéridos; el nivel de estos marcadores de sangre se puede dosificar fácilmente con métodos ya conocidos en la técnica; preferiblemente dos marcadores clínicos se seleccionan del grupo que consiste en edad, sexo, BMI, peso; preferiblemente, se realiza una puntuación.
- 40 De acuerdo con una segunda realización, la puntuación de fibrosis de la presente invención se determina a través del método descrito en WO2005/116901, incorporado en este documento como referencia.
- De acuerdo con una realización adicional, la puntuación de fibrosis se determina midiendo en una muestra de dicho paciente y combinando en una función de regresión logística al menos tres marcadores seleccionados en el grupo que
- 45 consiste en α -2 macroglobulina (A2M), ácido hialurónico (HA o hialuronato), apolipoproteína A1 (ApoA1), propéptido N-terminal de procógeno tipo III (P3P), gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT), bilirrubina, gammaglobulinas (GLB), plaquetas (PLT), nivel de protrombina (TP), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), urea, sodio (NA), glucemia (GLY), triglicéridos (TG), albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (PAL), YKL-40 (glicoproteína de cartílago humano 39), inhibidor tisular de la metaloproteínasa de matriz 1 (TIMP-1), metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), ferritina.
- 50 De acuerdo con otra realización, la puntuación de fibrosis se mide combinando los niveles de al menos tres marcadores biológicos seleccionados del grupo que consiste en glucemia (GLY), aspartato aminotransferasa (AST), alanina

aminotransferasa (ALT), ferritina, ácido hialurónico (HA), triglicéridos (TG), índice de protrombina (PI), gammaglobulinas (GLB), plaquetas (PLT), peso, edad y sexo.

5 De acuerdo con incluso otra realización, se miden y combinan al menos 2, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4, incluso más preferiblemente al menos 5 marcadores biológicos, e incluso más preferiblemente al menos 6 marcadores biológicos y opcionalmente puntuación de fibrosis y combinado en el método de la presente invención.

10 De acuerdo con otra realización, el método de acuerdo con la invención comprende además medir al menos un marcador clínico. Preferiblemente, el marcador clínico se selecciona del grupo que consiste en la edad (edad), el índice de masa corporal (BMI), el peso corporal, el perímetro de cadera, el perímetro abdominal y una proporción de los mismos, tales como por ejemplo perímetro de cadera/perímetro abdominal; más preferiblemente se miden dos marcadores clínicos.

15 De acuerdo con incluso otra realización, el método de acuerdo con la invención comprende medir al menos tres biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en glucemia (GLY), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ácido hialurónico (HA), hemoglobina (Hb) y triglicéridos, y al menos uno, preferiblemente dos marcadores clínicos seleccionados del grupo que consiste en la edad (edad), el índice de masa corporal (BMI), el peso corporal, el perímetro de cadera, el perímetro abdominal y una relación de los mismos, tales como, por ejemplo, perímetro de cadera/perímetro abdominal y una puntuación de fibrosis y combinación de dichos niveles de marcadores biológicos, puntuación de fibrosis medida y marcadores clínicos medidos, mediante una función matemática apropiada, preferiblemente una función logística o una función de regresión múltiple.

20 Esteatosis por MRI

Otra divulgación es un método para cuantificar el área de esteatosis hepática (AOS) en un paciente, que comprende realizar una MRI de eco de gradiente de eco múltiple denominada MFGRE sobre todo o parte del hígado del paciente, para medir el contenido de grasa hepática sobre la señal de MRI resultante y comparar dicho contenido de grasa hepática en la señal de MRI resultante al área de vacuolas de lípidos de la imagen de referencia.

25 (MFGRE) es un nuevo método desarrollado por el solicitante y basado en una secuencia de MRI de prototipo de eco múltiple. El principio de la secuencia es un gradiente de eco en fase y fuera de fase, pero con la adquisición de 16 ecos, permitiendo el cálculo preciso de los parámetros de decaimiento de señal: señal de agua (W), señal de grasa (F), campo local en homogeneidad (F) y ruido (N). La fracción de grasa se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{F}{W + F} \times 100 = \%F_{MFGRE}$$

30 Con este método, MFGRE se utiliza como un marcador no invasivo de esteatosis ya sea *per se* o con equivalencia en AOS utilizando una puntuación de regresión lineal. Este marcador se puede utilizar como parte de una prueba de la misma manera que un marcador de sangre o clínico.

Otra divulgación es un método para cuantificar un área de esteatosis hepática (AOS) en un paciente, que comprende:

a) medir el contenido de grasa en una señal de MRI del hígado de un paciente;

35 b) medir el nivel de al menos un marcador biológico y/o puntuación de fibrosis, y/o al menos uno, preferiblemente dos, marcador(es) clínico(s);

c) combinar el índice de contenido de grasa medido obtenido en la etapa (a) y los niveles medidos, puntuación y/o marcadores clínicos obtenidos en la etapa (b) en una función matemática apropiada.

40 De acuerdo con incluso otra realización, el método para cuantificar un área de esteatosis hepática (AOS) mide al menos 2, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4 e incluso más preferiblemente al menos 5 marcadores biológicos y más preferiblemente al menos 6 marcadores biológicos y opcionalmente puntuación de fibrosis en la etapa (b).

45 Otra divulgación es un método para diagnosticar la presencia y/o la gravedad de una esteatosis hepática o enfermedad de hígado graso en un paciente, que comprende implementar un método de medición del área de esteatosis como se describe en la presente invención. El método de la invención es de gran interés para diagnosticar y cuantificar lesiones hepáticas importantes, especialmente lesiones de NAFLD.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes a la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones preferidas de la misma, dada a modo de ejemplos con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1 Correlación entre las características morfométricas de la fibrosis hepática o esteatosis y las correspondientes pruebas de sangre en función de estadios de fibrosis o grados de esteatosis. Panel a: área de fibrosis, panel b: dimensión fractal de fibrosis, panel c: área de esteatosis, panel d: dimensión fractal de esteatosis. Las líneas representan la regresión lineal.
- 10 Figura 2 Relación entre el área y la dimensión fractal de esteatosis como una función de los grados de esteatosis. Las líneas representan las curvas de regresión LOWESS. El eje Y fue truncado para mostrar más detalles.
- Figura 3 Relación entre las pruebas de sangre para NAS (panel a) o NASH (panel b) (eje Y) y NAS (eje X). Esquemas de caja (mediana, rango intercuartil y extremos).
- 15 Figura 4 Relación entre el área y la dimensión fractal como una función de estadios de fibrosis o grados de esteatosis. Paneles izquierdos (a y c): resultados morfométricos. Paneles de la derecha (b y d): pruebas de sangre. Paneles superiores (a y b): fibrosis; paneles inferiores (c y d): esteatosis. Las líneas representan las curvas de regresión LOWESS.
- 20 Figura 5 Relación entre el área o la dimensión fractal de fibrosis o esteatosis (eje Y) como una función de los estadios de fibrosis (eje X). Paneles izquierdos (a y c): resultados morfométricos. Paneles de la derecha (b y d): pruebas de sangre. Paneles superiores (a y b): área; paneles inferiores (c y d): dimensión fractal. Esquemas de caja (mediana, rango intercuartil y extremos).
- La figura 6 representa la correlación entre la AOS (eje X) y la secuencia MFGRE por MRI (eje Y) en 23 pacientes: $R_s = 0.77$ y $R_{ic} = 0.85$.

Ejemplos

Pacientes y métodos

25 Pacientes

- Dos centros terciarios, Angers and Rennes (Francia), reclutaron prospectivamente a 245 pacientes con NAFLD entre 2001 y 2006. Los criterios de inclusión y exclusión se describen en otra parte (Cales P et al, J Hepatol 2009, 50:165-173). Diecinueve pacientes no fueron incluidos debido a que sus muestras hepáticas no estaban disponibles para su relectura; de este modo, la población principal incluía a 226 pacientes. Otras 22 biopsias hepáticas no fueron apropiadas para el análisis de imágenes.
- 30

Datos clínicos y pruebas de sangre

- 35 Se tomaron muestras de sangre en ayunas a la inclusión (fecha de la biopsia de hígado ± 7 días). Se incluyeron las variables clínicas y sanguíneas habituales, especialmente la glucosa en ayunas en la inclusión, así como los siguientes marcadores de fibrosis: ácido hialurónico, $\alpha 2$ -macroglobulina, apolipoproteína A1, índice de protrombina, plaquetas, aspartato y alanina aminotransferasa (AST, ALT), γ -glutamiltanspeptidasa, bilirrubina total y urea. Los métodos y reactivos se describieron previamente (Cales P et al, Clin Biochem 2008, 41:10-18). Una puntuación de fibrosis sanguínea específica para NAFLD se calculó de acuerdo con la puntuación publicada (Cales P et al, J Hepatol 2009, 50:165-173). La reproducibilidad interlaboratorio de los marcadores sanguíneos se evaluó como excelente en un estudio previo (Cales P et al, Clin Biochem 2008, 41:10-18).

40 Biopsia hepática

 Una biopsia de hígado percutánea se realizó generalmente en una semana (máximo 3 meses) de muestreo de sangre. Las longitudes de las muestras se midieron antes de la inclusión de parafina. A continuación, se tiñeron secciones de 5 μm de espesor con solución de hematoxilinoosina-azafrán o 0.1% de rojo picrosirius y se utilizaron tanto para análisis ópticos como de imagen.

45 Análisis óptico

 Las muestras de biopsia fueron reexaminadas centralmente por dos patólogos del hígado; los casos discordantes fueron revisados por un tercer patólogo para llegar a un consenso. La esteatosis, la inflamación lobular y el hinchamiento de los hepatocitos se clasificaron por separado de acuerdo con el sistema NASH Clinical Research Network (NASH-CRN) (Kleiner DE et al, Hepatology 2005, 41: 1313-1321). La adición de estos 3 grados proporcionó la puntuación de actividad

de NAFLD (NAS). El diagnóstico de NASH se evaluó de acuerdo con tres definiciones basadas en NAS: ≥ 3 , ≥ 5 y 0-2/3-4/5-7, respectivamente no, posible/límite, NASH definido (Kleiner DE et al, Hepatology 2005, 41: 1313-1321). La fibrosis se clasificó en 5 etapas, denominadas aquí F0 a F4, de acuerdo con la estadificación de NASH-CRN desarrollada específicamente para NAFLD (Kleiner DE et al, Hepatology 2005, 41: 1313-1321). La estadificación de Metavir (Hepatology 1994, 20: 15-20) desarrollada para hepatitis viral, pero también utilizada en enfermedades hepáticas crónicas alcohólicas y en NAFLD, también se evaluó para la fibrosis en estadio porto-septal en la zona acinar 1.

Análisis de imagen

Adquisición de imágenes - Se utilizó un procesador de imagen escáner de diapositivas digital Aperio (Scanscope® CS System, Aperio Technologies, Vista CA 92081, EE.UU.) que proporcionaba imágenes de alta calidad de 30.000 x 30.000 píxeles con una resolución de 0.5 μm /píxel (aumento x20). Se obtuvo una imagen binaria (blanco y negro) mediante una técnica de umbral automático utilizando un algoritmo desarrollado en nuestro laboratorio. Se analizó toda el área de la muestra. Se retiraron manualmente los artefactos de muestras de hígado (pliegues, polvo).

Algoritmo para esteatosis - Se han descrito previamente algunos aspectos del algoritmo (Roullier V et al., Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2007; 2007:5575-5578) y técnicas que proporcionan imágenes y mediciones de AOS han sido desarrolladas recientemente (Boursier J et al., J Hepatol 2009, 50:S357).

Datos calculados - AOF se midieron en las secciones de hígado completas, como se describió anteriormente (Pilette C et al., J Hepatol 1998, 28:439-446), pero con varias mejoras en la adquisición de imágenes como se describe anteriormente. AOS (%) se calculó como la proporción: área de las vesículas de esteatosis/superficie hepática completa, y AOS relativa (rAOS, %) como la relación: área de esteatosis/área hepática no fibrosa (esto es, superficie hepática completa menos AOF). Finalmente, se utilizó el método de recuento de cajas para evaluar la FD de Kolmogorov de esteatosis y fibrosis según se detalla en otra parte (Moal F et al., Hepatology 2002, 36: 840-849).

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como media $\pm$ SD, a menos que se especifique lo contrario. La regresión Lowess por mínimos cuadrados ponderados se utilizó para determinar la tendencia media de las relaciones entre variables (Borkowf CB et al. Stat Med 2003, 22:1477-1493). Los predictores independientes se determinaron mediante el método bootstrap. Este método también se determinó para calcular el sesgo de optimismo.

El rendimiento de diagnóstico se expresó mediante el área bajo la característica de funcionamiento del receptor (AUROC) o precisión de diagnóstico. Se determinaron los límites de diagnóstico de acuerdo con el índice máximo de Youden y la precisión diagnóstica. La regresión lineal múltiple por etapas y la regresión logística binaria se utilizaron para determinar variables independientes. En la regresión lineal, todas las variables categóricas fueron dicotomizadas y el rendimiento de cada modelo fue expresado por el R^2 ajustado (aR^2). Los programas informáticos de estadísticas eran SPSS versión 11.5.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Resultados

Características generales de los pacientes con NAFLD

Se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Características de 226 pacientes con NAFLD incluidos.

Variable	Valor (% o media $\pm$)
Demográfico:	
Sexo (% hombres)	75.2
Edad (años)	50.9 $\pm$ 10.8
Peso corporal (kg)	82.9 $\pm$ 15.8
BMI (kg/m^2)	28.7 $\pm$ 4.9
Muestra de hígado:	
Tamaño ^a (mm) por patólogo	30.5 $\pm$ 11.9
Tamaño ^b (mm) por ordenador	23.4 $\pm$ 23.6

Área ^b (mm ²)	11.7 ± 11.8
Fibrosis:	
Estadio de fibrosis por Metavir (%)	44.2 / 29.2 / 9.3 /
Estado de fibrosis por NASH-CRN (%)	26.1 / 29.7 / 21.6 /
Área de fibrosis (%)	6.4 ± 5.4
Dimensión fractal	1.14 ± 0.20
Esteatosis:	
Grado de esteatosis (% grado 0/1/2/3)	45.3 / 21.5 / 21.1 /
Área de esteatosis (%)	10.3 ± 9.7 ^c
Dimensión fractal	1.52 ± 0.17
Tasa de actividad NAFLD: 0-2, 3-4, 5-7	53.2 / 30.6 / 16.2
NASH (%)	46.8
^a Antes de la incrustación de parafina; ^b Mediante análisis computarizado de imágenes digitales teñidas; ^c intervalo: 0.2-42.5%; ^d NAS: interpretación: no, posible/límite, NASH definido.	

Diagnóstico de fibrosis

Fibrosis significativa

5

Rendimiento de diagnóstico - La prevalencia de fibrosis significativa fue significativamente mayor con NASH-CRN F≥2: 43.9% que con Metavir F≥2: 27.6% ($p < 10^{-3}$ por prueba de McNemar). Se ha comparado una prueba de sangre anterior dirigida a Metavir F≥2, denominado FibroMeter (FM) y un nuevo modelo de pruebas de sangre dirigido a NASH-CRN F≥2 (tabla 2). Las tablas 2 y 3 muestran un rendimiento muy bueno (AUROC alto) para las puntuaciones de la invención.

Tabla 2: Análisis multivariado que muestra variables independientemente asociadas con diferentes objetivos de diagnóstico.

10

El rendimiento de diagnóstico se expresó mediante cualquiera AUROC para la puntuación obtenida por regresión logística binaria o aR^2 para la puntuación obtenida por regresión lineal múltiple. En estos modelos, la predicción fue el objetivo principal, por lo que las condiciones de las variables independientes fueron menos estrictas que en un modelo explicativo.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación	Rendimiento
Fibrosis:				
Fibrosis significativa	Metavir F≥ 2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferretina, plaquetas	# 1A	AUROC = 0.940
	NASH-CRN F≥2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferretina, índice de protrombina	# 2A	AUROC = 0.884
Área de fibrosis		Ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas, índice de protrombina	# 3A	$aR^2 = 0.520$
Dimensión fractal de fibrosis		Ácido hialurónico, glucemia, AST, edad, índice de protrombina	# 4A	$aR^2 = 0.524$
Esteatosis:				

Esteatosis significativa	rAOS $\geq 3\%$	Glucemia, AST/ALT, triglicéridos, hemoglobina, edad, sexo + puntuaciones 1 y 2	# 5A	AUROC = 0.847
	NASH-CRN grado ≥ 1	Glucemia, AST, triglicéridos, AST/ALT, hemoglobina, BMI, peso + puntuaciones 1, 2 y 4	# 6A	AUROC = 0.848
Área de esteatosis		Glucemia, AST, triglicéridos, BMI, peso + puntuación 1 y	# 7A	aR ² = 0.365
Dimensión fractal de esteatosis		Glucemia, AST, ALT, triglicéridos, BMI, peso + puntuaciones 1 y 2	# 8A	aR ² = 0.346
NASH:				
NASH		AST, ferritina, AST.ALAT + puntuaciones 2, 5 y 8	# 9A	AUROC = 0.895
AST: aspartato aminotransferasa ALT: alanina aminotransferasa BMI: índice de masa corporal				

Tabla 2bis: Análisis multivariado que muestra variables independientemente asociadas con diferentes objetivos de diagnóstico.

5 El rendimiento de diagnóstico se expresó mediante cualquiera AUROC para la puntuación obtenida por regresión logística binaria o aR^2 para la puntuación obtenida por regresión lineal múltiple. En estos modelos, la predicción fue el objetivo principal, por lo que las condiciones de las variables independientes fueron menos estrictas que en un modelo explicativo.

Puntuación	Objetivo de diagnóstico	Variables	Coefficiente β	Exp (β)	95% de CI Exp (β) inf	95% de CI Exp (β) sup
1a	Fibrosis significativa Metavir F ≥ 2					
N = 225		Intercepto	-11.044	-	-	-
		Edad	0.071	1.074	1.021	1.130
		Peso	0.047	1.048	1.016	1.082
	AUROC = 0.941	Glucemia	0.429	1.536	1.120	2.106
	(0.927)	AST	0.066	1.069	1.041	1.097
		ALT	-0.024	0.976	0.960	0.993
		Ferretina	0.0009	1.001	1.000	1.002
		Plaquetas	-0.0103	0.990	0.982	0.998
2a	Fibrosis significativa NASH-CRN F ≥ 2		Coefficiente β	Exp (β)	95% de CI Exp (β) inf	95% de CI Exp (β) sup
N = 221		Intercepto	-6.269	-	-	-
		Edad	0.033	1.034	0.996	1.072
		Peso	0.053	1.055	1.024	1.086

	AUROC = 0.884	Glucemia	0.388	1.474	1.013	2.146
	(0.867)	AST	0.059	1.060	1.033	1.088
		ALT	-0.014	0.986	0.973	0.998
		Ferretina	0.001	1.001	1.000	1.002
		Índice de protrombina	-0.046	0.955	0.916	0.996
3a	Área de fibrosis		Coefficiente β		95% de CI (β) inf	95% de CI (β) sup
N = 202		Intercepto	11.597		5.724	17.470
		Glucemia	0.441		0.161	0.721
	$aR^2 = 0.520$	AST	0.049		0.023	0.076
	(0.503)	ALT	-0.021		-0.037	-0.005
		Plaquetas	-0.008		-0.016	0.001
		Índice de protrombina	-0.089		-0.151	-0.027
		Ácido hialurónico	0.021		0.015	0.027
4a	Dimensión fractal de fibrosis		Coefficiente β		95% de CI (β) inf	95% de CI (β) sup
N=202		Intercepto	0.920		0.636	1.203
		Edad	0.003		0.001	0.005
	$aR^2 = 0.507$	Peso	0.002		0.0003	0.003
	(0.495)	Glucemia	0.025		0.014	0.035
		AST	0.001		0.0007	0.002
		Índice de protrombina	-0.004		-0.006	-0.001
		Ácido hialurónico	0.001		0.0003	0.0008
5a	Esteatosis significativa (rAOS $\geq 3\%$)		Coefficiente β	Exp (β)	95% de CI Exp (β) inf	95% de CI Exp (β) sup
N = 151		Intercepto	-5.090	-	-	-
		Edad	-0.065	0.937	0.880	0.998
		Sexo (M:0, F:1)	1.422	4.145	0.905	18.971
	AUROC = 0.866	Triglicéridos	0.956	2.602	1.203	5.624
		Glucemia	0.479	1.614	0.974	2.675
		AST/ALT	-2.588	0.075	0.010	0.559

ES 2 621 838 T3

		Hemoglobina	0.238	1.269	0.765	2.105
		Puntuación 1a	-8.416	<0.001	<0.001	0.071
		Puntuación 2a	13.450	>999.99	>999.99	>999.99
6a	Esteatosis significativa NASH-CRN grado $\geq$ 1		Coeficiente β	Exp (β)	95% de CI Exp (β) inf	95% de CI Exp (β) sup
N=162		Intercepto	-2.5933	-	-	-
		Peso	-0.1066	0.899	0.846	0.956
		BMI	0.3864	1.472	1.189	1.822
	AUROC = 0.898	Glucemia	1.2142	3.368	1.738	6.525
		Triglicéridos	0.8002	2.226	1.141	4.344
		AST	0.0324	1.033	1.007	1.060
		AST/ALT	-2.4952	0.082	0.008	0.803
		Hemoglobina	0.3510	1.421	0.899	2.246
		Puntuación 1a	-9.6939	<0.001	<0.001	0.010
		Puntuación 2a	14.8116	>999.99	>999.99	>999.99
		Puntuación 4a	-14.2847	<0.001	<0.001	0.674
7a	Área de esteatosis (log)		Coeficiente β		95% de CI (β) inf	95% de CI (β) sup
N = 151		Intercepto	-2.28009		-3.64226	-0.91793
		Peso	-0.01128		- 0.02990	0.00735
		BMI	0.10169		0.03838	0.16500
	$aR^2 = 0.310$	Glucemia	0.18799		0.05920	0.31679
		Triglicéridos	0.20372		0.04126	0.36617
		AST	0.00922		0.00222	0.01621
		Puntuación 1a	-3.24488		-4.55881	-1.93095
		Puntuación 2a	2.66894		1.34807	3.98981
8a	Dimensión fractal de esteatosis		Coeficiente β		95% de CI (β) inf	95% de CI (β) sup
N=151		Intercepto	0.95361		0.70956	1.19766
		Peso	-0.00238		-0.00529	0.00054241
		BMI	0.01580		0.00592	0.02568
		Glucemia	0.02984		0.00932	0.05037
	$aR^2 = 0.350$	Triglicéridos	0.03147		0.00637	0.05656

		AST	0.00438		0.00144	0.00733
		AST/ALT	-0.18234		-0.31060	-0.05407
		AST.ALT	-0.00002		-0.00003124	0.00000319
		Puntuación 1a	-0.40669		- 0.61323	- 0.20016
		Puntuación 2a	0.43128		0.21917	0.64338
9a	NASH (NAS≥3)		Coeficiente β	Exp (β)	95% de CI Exp (β) inf	95% de CI Exp (β) sup
N = 162		Intercepto	-20.2665	-	-	-
		AST	0.1253	1.133	1.048	1.226
		AST.ALT	-0.00042	1.000	0.999	1.000
	AUROC = 0.899	Ferretina	0.00275	1.003	1.001	1.005
		Puntuación 2a	-4.3346	0.013	<0.001	0.285
		Puntuación 5a	4.0033	54.779	1.932	>999.99
		Puntuación 8a	9.4028	>999.99	3.123	>999.99
AST: aspartato aminotransferasa ALT: alanina aminotransferasa BMI: índice de masa corporal						

Tabla 3: Análisis multivariado que muestra variables independientemente asociadas con diferentes objetivos de diagnóstico.

- 5 El rendimiento diagnóstico se expresó mediante ya sea AUROC para la puntuación obtenida por regresión logística binario/ordinal o aR^2 para la puntuación obtenida por regresión lineal múltiple. Las figuras entre paréntesis indican AUROC corregida con sesgo de optimismo. En estos modelos, la explicación fue el objetivo principal, por lo que las condiciones de las variables independientes fueron más estrictas que en un modelo predictivo. Las variables fueron seleccionadas por el método bootstrap paso a paso.

Objetivo de diagnóstico		Variables independientes	Puntuación	Rendimiento
Fibrosis:				
Fibrosis significativa	Metavir F≥ 2	Peso, edad, glucemia, AST, ALT, ferritina, plaquetas a	# 1B	AUROC = 0.932 (0.918)
	NASH-CRN F≥2	Peso, glucemia, AST, ALT, índice de protrombina	# 2B	AUROC = 0.866 (0.856)
Área de fibrosis		Ácido hialurónico, glucemia, AST, ALT, plaquetas, índice de protrombina	# 3B	$aR^2=0.530$ (0.518)
Dimensión fractal de fibrosis		Ácido hialurónico, glucemia, AST/ALT, peso, plaquetas	# 4B	$aR^2=0.529$ (0.517)
Esteatosis				

Esteatosis significativa	rAOS $\geq 3\%$	BMI, glucemia, triglicéridos	# 5B	AUROC=0.797 (0.782)
	NASH-CRN grado ≥ 1	BMI, glucemia, triglicéridos, ferretina	# 6B	AUROC=0.831 (0.815)
Área de esteatosis (log)		BMI, glucemia, triglicéridos, ferretina	# 7B	$aR^2=0.213$ (0.198)
Dimensión fractal de esteatosis		BMI, glucemia, triglicéridos, ferretina	# 8B	$aR^2=0.247$ (0.230)
NASH b:				
NAS ≥ 3		BMI, AST, ferritina	# 9B	AUROC=0.846 (0.836)
NAS ≥ 5		Ferretina	# 10B	AUROC=0.709 (0.708)
NAS 0-2 / 3-4 / 5-7		BMI, AST, ferritina	# 11B	AUROC=0.815
AST: aspartato aminotransferasa ALT: alanina aminotransferasa BMI: índice de masa corporal a El modelo original determinado por regresión logística binaria convencional b De acuerdo con 3 definiciones basadas en NAS				

Tabla 3bis: Análisis multivariado que muestran variables independientemente asociadas con diferentes objetivos de diagnóstico.

- 5 El rendimiento diagnóstico se expresó mediante ya sea AUROC para la puntuación obtenida por regresión logística binario/ordinal o aR^2 para la puntuación obtenida por regresión lineal múltiple. Las figuras entre paréntesis indican AUROC corregida a partir del sesgo de optimismo. En estos modelos, la explicación fue el objetivo principal, por lo que la condición de no-colinealidad entre variables independientes fue más estricta que en un modelo predictivo. Las variables se seleccionaron mediante un método bootstrap (análisis de regresión por etapas en 1.000 muestras de bootstrap).

Puntuación	Objetivo de diagnóstico	Variables	Coefficiente β	Exp (β)	95% de CI inf	95% de CI sup
1b	Fibrosis significativa Metavir F ≥ 2				Exp (β)	Exp (β)
		Intercepto	-6.9269	-	-	-
		Edad	0.0671	1.069	1.016	1.126
		Glucemia	0.4239	1.528	1.125	2.076
		AST	0.0585	1.060	1.034	1.087
		ALT	-0.0184	0.982	0.968	0.996
		Ferretina	0.00112	1.001	1.000	1.002
		Plaquetas	-0.0105	0.990	0.982	0.997

ES 2 621 838 T3

2b	Fibrosis significativa NASH-CRN F≥2				Exp (β)	Exp (β)
		Intercepto	-3.6323	-	-	-
		Peso	0.0539	1.055	1.026	1.086
		Glucemia	0.5166	1.676	1.131	2.485
		AST	0.0695	1.072	1.044	1.101
		ALT	-0.0189	0.981	0.969	0.994
		Índice de protrombina	-0.0594	0.942	0.905	0.981
3b	Área de fibrosis				β	β
		Intercepto	11.59720		5.72423	17.47017
		Glucemia	0.44087		0.16118	0.72055
		AST	0.04949		0.02291	0.07606
		ALT	-0.02083		- 0.03661	-0.00505
		Plaquetas	-0.00752		- 0.01641	0.00138
		Índice de protrombina	-0.08903		- 0.15085	-0.02721
		Ácido hialurónico	0.02122		0.01509	0.02736
4b	Dimensión fractal de fibrosis				β	β
		Intercepto	0.74800		0.59622	0.89978
		Peso	0.00247		0.00120	0.00374
		Glucemia	0.02634		0.0163 0	0.03637
		AST/ALT	0.19838		0.12788	0.26888
		Plaquetas	-0.0005524		-0.0008494	-0.0002553
		Ácido hialurónico	0.00035650		0.00011211	0.00060090
5b	Esteatosis Significativa (rAOS ≥3%)				Exp (β)	Exp (β)
		Intercepto	-10.8186	-	-	-
		BMI	0.2667	1.306	1.136	1.500
		Glucemia	0.5154	1.674	1.047	2.678
		Triglicéridos	0.9728	2.645	1.388	5.042

6b	Esteatosis Significativa NASH-CRN grado ≥ 1				Exp (β)	Exp (β)
		Intercepto	-11.1031	-	-	-
		BMI	0.2124	1.237	1.108	1.380
		Glucemia	0.6451	1.906	1.180	3.080
		Triglicéridos	0.7650	2.149	1.261	3.663
		Ferretina	0.00149	1.001	1.000	1.003
7b	Área de esteatosis (log)				β	β
		Intercepto	-1.78517		- 2.98336	-0.58698
		BMI	0.08947		0.05079	0.12815
		Glucemia	0.09542		-0.02158	0.21241
		Triglicéridos	0.22814		0.05665	0.39963
		Ferretina	0.0002852		-0.0001074	0.0006778
8b	Dimensión fractal de esteatosis				β	β
		Intercepto	0.91010		0.72363	1.09658
		BMI	0.01502		0.00900	0.02103
		Glucemia	0.01625		-0.00195	0.03446
		Triglicéridos	0.03534		0.00865	0.06203
		Ferretina	0.0000576		-0.0000035	0.0001187
9b	NASH (NAS ≥ 3)				Exp (β)	Exp (β)
		Intercepto	-7.5364	-	-	-
		BMI	0.1596	1.173	1.059	1.300
		AST	0.0479	1.049	1.024	1.075
		Ferretina	0.00256	1.003	1.001	1.004
10b	NASH (NAS ≥ 5)					
		Intercepto	-2.4712	-	-	-
		Ferretina	0.00148	1.001	1.001	1.002
11b	NASH (NAS 0-2/3-4/5- 7)					
		Intercepto 3	-7.3898	-	-	-

		Intercepto 3	-5.3943	-	-	-
		BMI	0.1258	1.134	1.048	1.228
		AST	0.0255	1.026	1.010	1.042
		Ferretina	0.00158	1.002	1.001	1.003

Área y dimensión fractal de fibrosis

5 Por regresión lineal múltiple, se obtuvo la mayor precisión con una combinación de los predictores independientes de AOF (véanse las tablas 2 y 3). De este modo, la correlación entre AOF pronosticada mediante prueba de sangre y medida por biopsia de hígado fue: $r_p=0.731$ ($p<10^{-3}$) (figura 1a). La mayor exactitud para la fibrosis FD se obtuvo con una combinación de los predictores independientes (véanse las tablas 2 y 3). De este modo, la correlación entre fibrosis FD pronosticada mediante prueba de sangre y medida por biopsia de hígado fue: $r_p = 0.734$ ($p<10^{-3}$) (figura 1b).

Diagnóstico de esteatosis hepática

Esteatosis significativa

10 Rendimiento de diagnóstico - La esteatosis significativa se definió de dos maneras. Se definió por primera vez por rAOS $\geq 3\%$ ya que el área de la parcela vs FD mostró una inflexión en rAOS $\approx 3\%$ y FD ≈ 1.4 (figura 2). La segunda definición se basó en NASH-CRN grado ≥ 1 . La prevalencia de esteatosis fue significativamente mayor con rAOS $\geq 3\%$: 68.8% que con NASH-CRN grado ≥ 1 : 54.7% ($p<10^{-3}$ por prueba de McNemar).

15 Utilizando la regresión logística binaria, se diagnosticó esteatosis significativa definida por rAOS $\geq 3\%$ por las variables independientes como se muestra en las tablas 2 y 3. El rendimiento de diagnóstico de este modelo fue: AUROC: 0.797 ± 0.027 (IC del 95% 0.804-0.911), precisión general: 77.4%.

Utilizando NASH-CRN grado ≥ 1 como objetivo de diagnóstico, la mejor puntuación se muestra en las tablas 2 y 3.

Cantidad de esteatosis

20 Utilizando la regresión lineal múltiple, se pudo estimar la rAOS, con una precisión moderada ($aR^2 = 0.213$), mediante una puntuación que incluía sangre y variables clínicas como se muestra en las tablas 2 y 3. De este modo, la correlación entre rAOS pronosticada mediante prueba de sangre y medida por biopsia de hígado fue: $r_p = 0.647$ ($p<10^{-3}$) (figura 1c).

Dimensión fractal de esteatosis

25 Utilizando una regresión lineal múltiple, se pudo estimar la FD de esteatosis, con una precisión moderada ($aR^2 = 0.247$), mediante una puntuación que incluía sangre y variables clínicas como se muestra en las tablas 2 y 3. De este modo, la correlación entre la FD de esteatosis pronosticada mediante prueba de sangre y medida por biopsia de hígado fue: $r_p=0.621$ ($p<10^{-3}$) (figura 1d).

Diagnóstico de NASH

30 La NASH se pronosticó independientemente como se muestra en las tablas 2 y 3 con AUROC correspondiente. La correlación entre NASH pronosticada mediante prueba de sangre y NAS medida por biopsia de hígado fue: $r_s = 0.726$ ($p<10^{-3}$) (figura 3b).

Relación entre lesiones

Con el fin de validar las pruebas de sangre, se evaluó la capacidad de estas pruebas para reflejar las relaciones entre lesiones.

35 Área y FD - La relación exponencial entre AOF histológico y FD ($r_s = 0.971$, $p<10^{-3}$) se reflejó bien en la relación entre las respectivas pruebas de sangre ($r_s = 0.861$, $p < 10^{-3}$) (figura 4a y B).

La relación exponencial entre el rAOS histológico y la esteatosis FD ($r_s = 0.976$, $p<10^{-3}$) se reflejó bien en la relación entre las respectivas pruebas de sangre ($r_s = 0.886$, $p<10^{-3}$) (figura 4c y d).

Fibrosis y esteatosis - Estadio de fibrosis NASH-CRN se considera en este documento como una referencia cronológica ya que se supone que aumenta en función del tiempo. AOS alcanzó su punto máximo en el estadio 2 de la fibrosis

NASH-CRN con una curva cuadrática, mientras que la AOF aumentó casi linealmente en función del estadio de fibrosis (figura 5a). Estas relaciones se reflejaron bien en las pruebas de sangre respectivas, excepto para AOS en F4, pero hubo algunos pacientes (figura 5b). Las mismas curvas se observaron con FD de fibrosis o esteatosis (figura 5c), mientras que se reflejaron bien en las respectivas pruebas de sangre (figura 5d).

5 Estudios de MRI

Se incluyeron 21 pacientes con esteatohepatitis, junto con dos controles sin esteatohepatitis.

Se realizó una biopsia de hígado con el fin de diagnosticar esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica.

El grado de esteatosis fue evaluado por un experto utilizando la clasificación de esteatosis

- S0 (0% de hepatocitos),

10 - S1 (menos del 10%),

- S2 (entre el 10% y el 30%),

- S3 (entre el 30% y el 50%) y

- S4 (más del 50%).

15 El área de esteatosis (AOS) (en porcentaje) se calculó mediante nuestro método de análisis automático de imágenes, previamente descrito en la presente solicitud, que mide el área de vacuolas lipídicas presentadas en hepatocitos.

Se implementaron métodos de cuantificación por MRI, ya descritos en la literatura, a saber: Hussain, Fast Spin Echo con y sin saturación de grasa (FSE), Dixon de 2 puntos y Dixon de 3 puntos.

Se desarrolló un método adicional basado en MRI de eco de gradiente de eco múltiple (MFGRE), como se describió previamente en la presente solicitud, y se aplicó.

20 Las correlaciones fueron evaluadas por el coeficiente de correlación de Spearman (R_s) y el coeficiente de correlación intraclase (R_{ic}).

Resultados

La distribución de nuestra población por clasificación de esteatosis fue:

- S0 = 2 pacientes,

25 - S1 = 4 pacientes,

- S2 = 4 pacientes,

- S3 = 7 pacientes y

- S4 = 6 pacientes.

Correlación entre la clasificación de esteatosis y AOS:

30 AOS se correlacionó con los grados de esteatosis ($R_s = 0.82$ y $p < 0.001$). AOS fue significativamente diferente entre todos los grados de esteatosis ($p < 0.001$), por ejemplo, entre grados S0 a S2 (menos del 30%) y grados S3 a S4 (más del 30%), respectivamente: 4.2 ± 2.4 versus 16.4 ± 8.9 ($p < 0.001$).

35 Correlación entre los métodos de cuantificación de MRI y la clasificación de esteatosis: La correlación intraclase entre los grados de esteatosis y los métodos de cuantificación de MRI fue $R_s = 0.66$ para MFGRE, $R_s = 0.69$ para Hussain, $R_s = 0.80$ para FSE; $R_s = 0.68$ para Dixon de 2 puntos y $R_s = 0.73$ para Dixon de 3 puntos ($p < 0.001$ para todas las correlaciones).

Correlación entre la cuantificación de MRI y AOS:

La cuantificación de esteatosis por método MFGRE se correlacionó mejor con AOS ($R_s = 0.77$ y $R_{ic} = 0.85$) (véase la Figura 6).

Los coeficientes de correlación obtenidos por otros métodos fueron, respectivamente: 0.71 y 0.57 para Hussain, 0.80 y 0.61 para FSE; 0.71 y 0.55 para Dixon de 2 puntos; 0.61 y 0.28 para Dixon de 3 puntos.

En la regresión lineal múltiple, MFGRE fue el único método de cuantificación de MRI independientemente ligado a AOS.

Reivindicaciones

1. Un método no invasivo *in vitro* para cuantificar las lesiones del hígado de un paciente que comprende:

medir los siguientes biomarcadores en una muestra del paciente: plaquetas, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), ferritina y glucemia y medir los siguientes marcadores clínicos: edad y peso, y combinar dichas medidas en una función logística.

5

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lesión es debida o está relacionada con insuficiencia hepática, fibrosis hepática, esteatosis hepática, enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

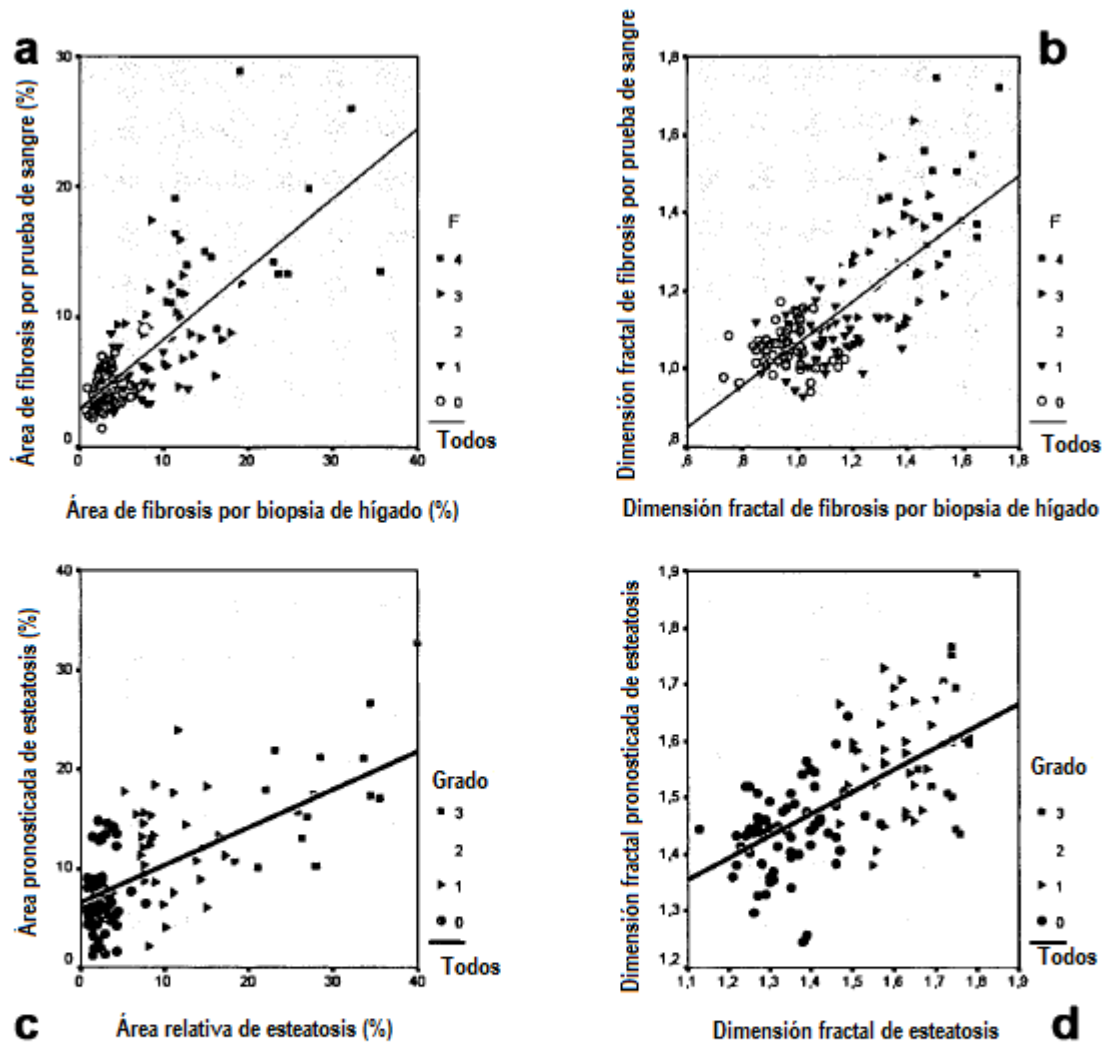


FIGURA 1

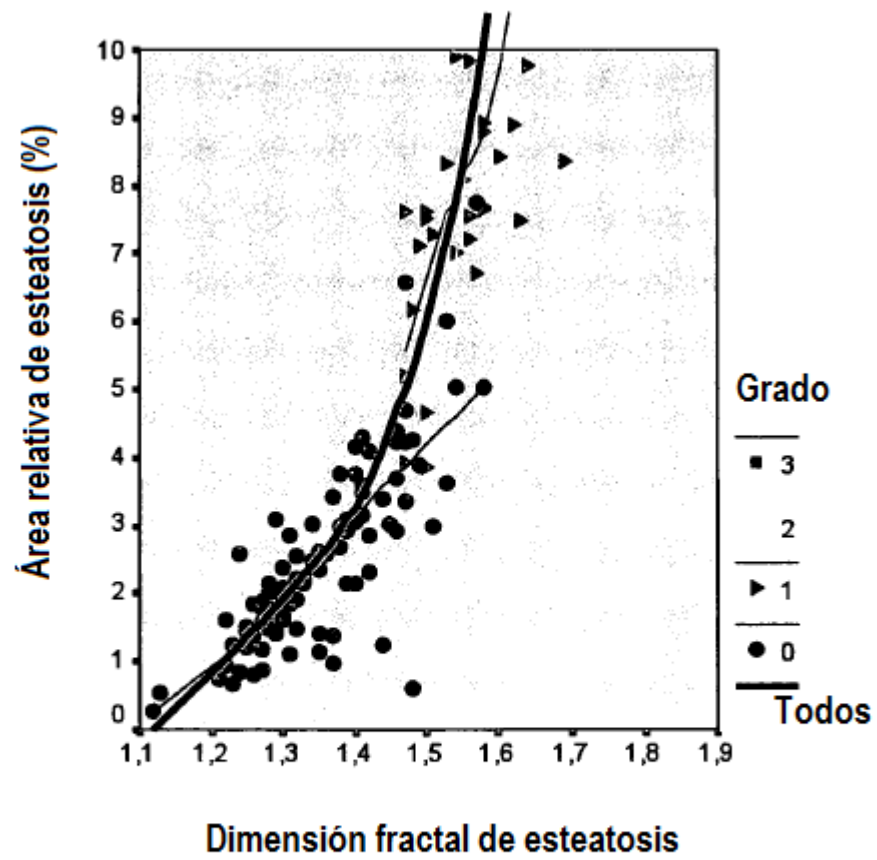


FIGURA 2

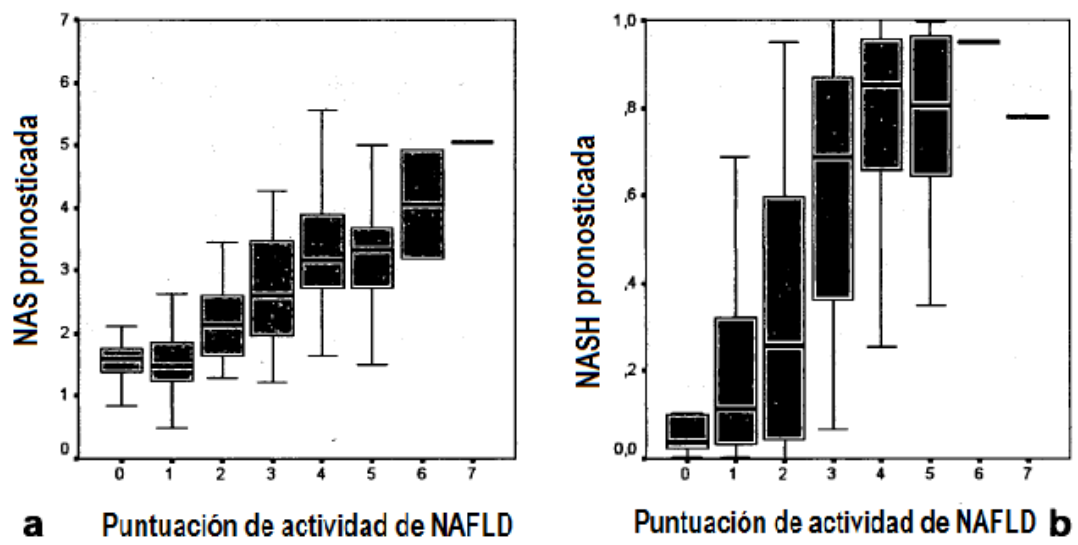


FIGURA 3

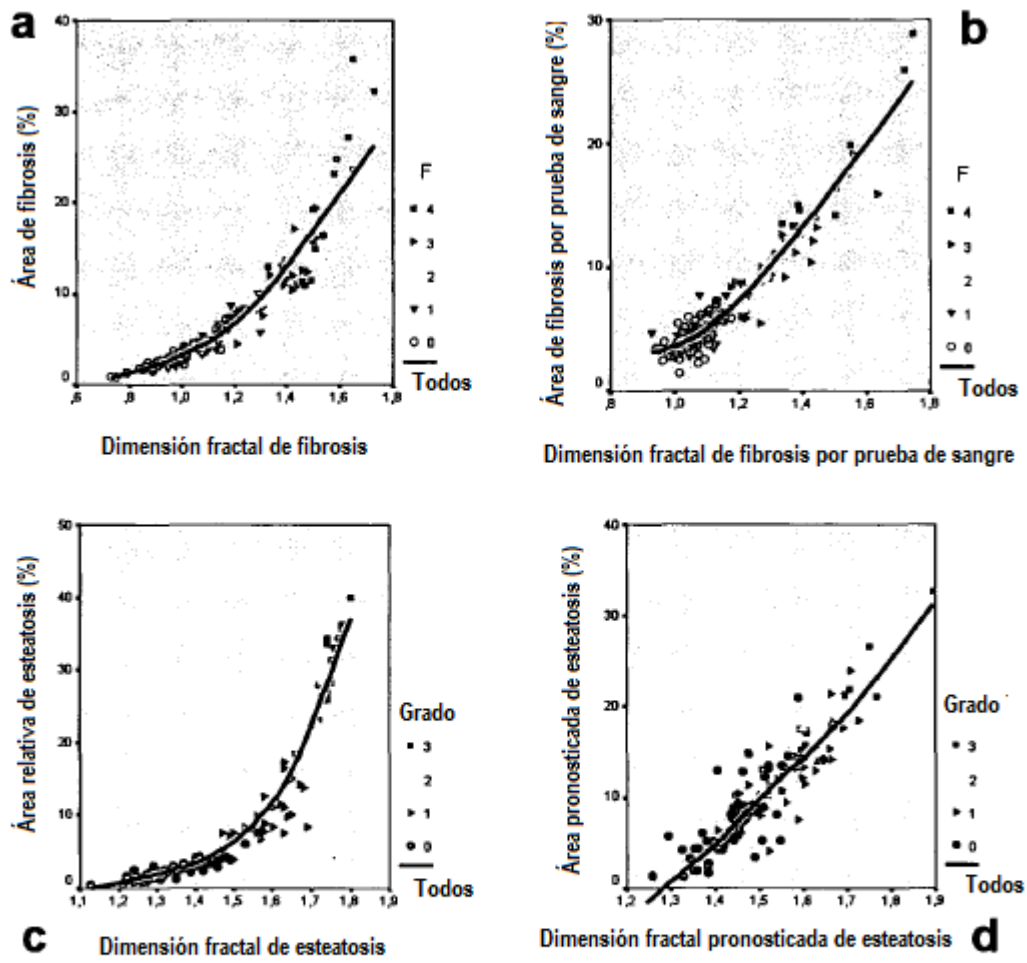


FIGURA 4

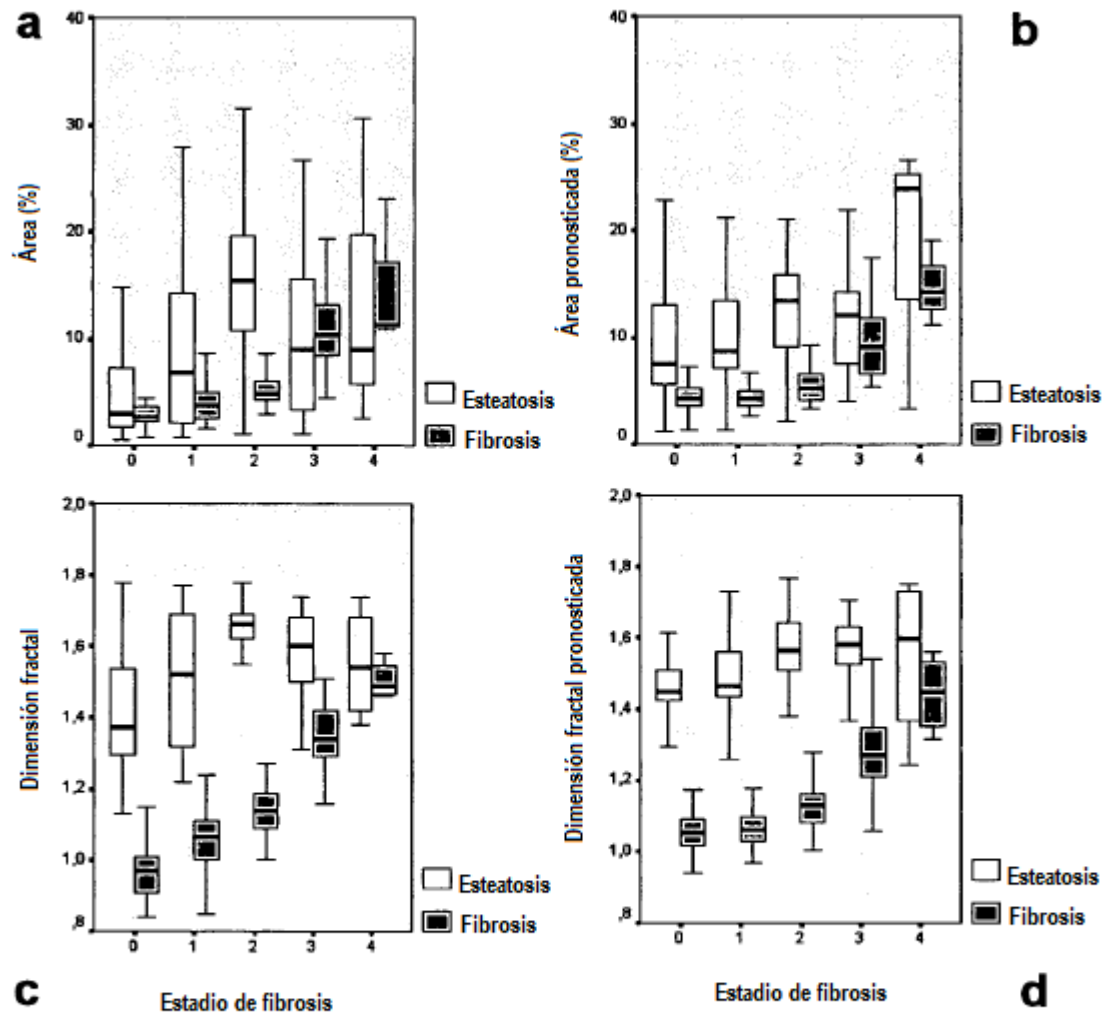


FIGURA 5

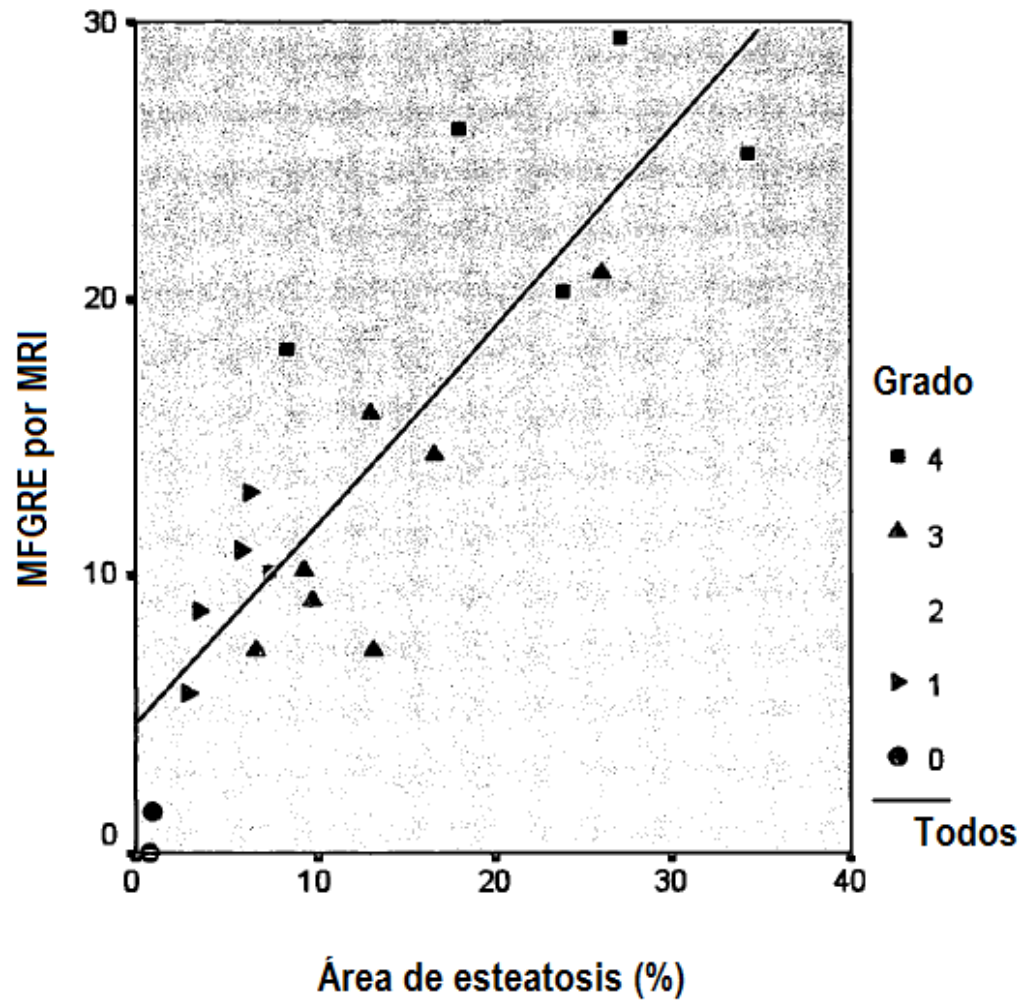


FIGURA 6