

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 494**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010** E 14169636 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** EP 2770327

54 Título: **Ensayo de biomarcador de fibrosis**

30 Prioridad:

30.03.2009 US 211467 P
22.12.2009 US 289081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 635 494 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de biomarcador de fibrosis

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

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

Tabla 1. Diferentes enfermedades fibróticas²

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

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

La fibrosis es el resultado final de las reacciones inflamatorias crónicas que se inducen por una variedad de estímulos que incluyen las infecciones persistentes, las reacciones autoinmunes, las respuestas alérgicas, los daños químicos, la radiación y la lesión tisular. La fibrosis se caracteriza por la acumulación y la reorganización de la matriz extracelular (ECM). A pesar de tener distinciones etiológicas y clínicas evidentes, la mayoría de los trastornos fibróticos crónicos tienen en común una irritación persistente que sustenta la producción de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogénicas, que en conjunto estimulan la deposición de elementos del tejido conectivo, especialmente de colágenos y proteoglicanos, que remodelan progresivamente y destruyen la arquitectura normal del tejido^{3,4}. A pesar de su enorme impacto en la salud humana, actualmente no existen tratamientos aprobados que se destinen directamente a los mecanismos de la fibrosis⁵.

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

Matriz Extracelular (ECM)

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

Colágeno

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

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

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

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

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

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

55 Durante la fibrogénesis la cantidad neta de colágenos aumenta ¹²⁻¹⁴. La Tabla 3 muestra, en forma de ejemplo, el aumento de colágeno durante la fibrosis hepática.

Tabla 3. Cambios de la composición de colágeno entre el hígado humano normal y el cirrótico ¹⁵.

60

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

25 Elastina

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

La elastina cumple una importante función en las arterias como un medio para la propagación de la onda de presión para ayudar al flujo sanguíneo y es particularmente abundante en los grandes vasos sanguíneos elásticos tales como la aorta. La elastina es también muy importante en los pulmones, los ligamentos elásticos y la piel. A pesar de muchos esfuerzos que se dedican a la comprensión de la síntesis y de la facturación de la elastina, los neo-epítomos procedentes del escisión proteolítico de estas moléculas de la matriz no se asocian hasta ahora con el desarrollo de la enfermedad en la fibrosis.

40 Vimentina

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

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

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

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

60 Proteoglicanos

Los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas, que unen covalentemente un número variable de cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG) a una proteína núcleo ¹⁶. Estos GAGs son polímeros de repeticiones de disacáridos (por ejemplo, N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina), que son ácidos (cargados negativamente) debido a los grupos laterales sulfatados y carboxilados, e hidroxilo en las unidades de disacárido. Esto los hace

altamente hidrofílicos, ayudando así a la difusión del agua y de los iones positivos (por ejemplo, el sodio de los fluidos extracelulares) ¹⁷. Además, los GAGs tienen la capacidad de formar enlaces no covalentes por ejemplo con las cadenas de ácido hialurónico para formar complejos moleculares aún mayores ¹⁶. La Tabla 4 enumera los proteoglicanos más estudiados que se asocian con el tejido conectivo.

5

Tabla 4. Proteoglicanos de la matriz extracelular del tejido conectivo

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

60

Proteína C-reactiva

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

65

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

Proteasas

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

MMPs

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

Tabla 5. MMPs en el hígado³⁰⁻³²

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

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

Tabla 6. TIMPs en el hígado³¹

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

10 Proteína activadora de fibroblastos

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

Biomarcadores de la fibrosis

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

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

Biomarcadores	Parámetros	Enfermedad crónica del hígado	Referencia
Un parámetro			
CRP		NASH	43
Hialuronano		HCV	44-47
IGF-I		HCV	48
Leptina		HCV	49
PIIIP		HCV	50
Varios parámetros			
	Parámetros	Enfermedad crónica del hígado	Referencias
MP3	PIIINP, MMP1	HCV	51, 52
En el índice Zheng y otros	HA, PIIICP, PIIINP, Laminina, C-IV	Hepatitis crónica	53
En el índice Lebenszjtjen y otros	Laminina-2, C-IV, MMP2, índice de MMP9-TIMP1	HBV	54
	Tenascina, hialuronano, Colágeno VI, TIMP-1	HBV	55
En el índice Tsochatzis y otros	Leptina, adiponectina, resistina	HCV, HBC, NASH	56
En el índice Patel y otros	Hialuronano, TIMP-1, α2-macroglobulina	HCV	57
	TIMP-1, tenascina, colágeno IV, PIIINP, MMP2, laminina, Hialuronano	NASH	58

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

La patente US5387504 describe el neo-epítipo VDIPEN que se libera por la acción de la estromelina en el sitio N₃₄₁ - F₃₄₂ del agrecano y un ensayo RIA que emplea un anticuerpo monoclonal específico para este neo-epítipo. Más generalmente se describe el uso de anticuerpos mono-específicos para los fragmentos de agrecano, que se generan por escisión de una estromelina específica. Las elevaciones de la estromelina se producen en la osteoartritis, la artritis reumatoide, las lesiones ateroscleróticas, la gota, la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), ciertos tipos de cáncer, las lesiones en las articulaciones, y numerosas enfermedades inflamatorias. Se informó que la estromelina se eleva en la fibrosis pulmonar idiopática, y se alega que el ensayo puede llevarse a cabo con la sangre u otros fluidos biológicos para detectar los productos de la escisión por la estromelina del agrecano y que la cuantificación de tales fragmentos se puede utilizar para el diagnóstico en relación

con la IPF así como también en relación con otras condiciones. Sin embargo, no existe evidencia de esto ni publicaciones posteriores en nuestro conocimiento que validen esta predicción. Dichos ensayos RIA están disponibles comercialmente desde muchos años atrás y no hay informes de su uso exitoso en diagnosticar o supervisar cualquier enfermedad fibrótica.

5

La Patente de Estados Unidos 7,225,080 describe un método para el diagnóstico de una enfermedad inflamatoria, fibrótica o cancerosa en un paciente mediante la medición de los valores de al menos cuatro marcadores bioquímicos seleccionados del grupo que consiste en α 2-macroglobulina, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gammaglutamil transpeptidasa), γ -globulina, bilirrubina total, albúmina, α 1-globulina, α 2-globulina, haptoglobina, β -globulina, apoA1, IL-10, TGF- β 1, apoA2, y apoB en el suero o plasma de dicho paciente y posteriormente combinar dichos valores para determinar la presencia de fibrosis hepática y/o de lesiones necroinflamatorias en el hígado de dicho paciente. La patente no enseña la medición cuantitativa del fragmento de péptido que porta los neo-epítomos que se generan durante la enfermedad fibrótica.

10

15

La Patente de Estados Unidos 6,060,255 describe un método para diagnosticar el grado de fibrosis hepática, que comprende las etapas de medir la concentración de la forma de alto peso molecular del colágeno tipo IV en una muestra mediante el uso de un anticuerpo que se une específicamente al colágeno tipo IV y relacionar la medición con el grado de fibrosis hepática. De nuevo, no se hace uso de los neo-epítomos que se producen por las enzimas proteolíticas que actúan en el cuerpo. La muestra se digiere en realidad con pepsina, lo que puede oscurecer el patrón natural de escisión del colágeno en la muestra.

20

La Patente de Estados Unidos 4,628,027 (Gay) describe la producción de anticuerpos específicos para las proteínas del tejido conectivo y, más particularmente, la producción de anticuerpos monoclonales por los híbridos de células fusionadas contra los colágenos humanos y las enzimas que participan en la degradación del colágeno. Se describe el uso de anticuerpos monoclonales contra las proteínas del tejido conectivo para establecer el perfil de colágeno de muestras histológicas, citológicas y de fluidos biológicos. Sin embargo, la patente no describe la medición de las proteínas del tejido conjuntivo sobre la base de la unión de los anticuerpos a los neo-epítomos en dichas proteínas del tejido conectivo.

25

30

Guañabens N y otros, J Bone Miner Res, 1998⁹⁸ evaluaron los marcadores del recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX), C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) y N-terminal pro-péptido del colágeno de tipo I (PINP) en pacientes con cirrosis biliar primaria, una enfermedad con aumento de la fibrosis hepática. Los niveles de NTX, CTX y PINP se elevan en los pacientes en comparación con los controles y se correlacionan con la etapa histológica de la enfermedad. Los anticuerpos empleados en el NTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y dependen del neopéptido JYDGKGVG↓. Los anticuerpos empleados en el CTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el extremo C del colágeno tipo I y dependen del neopéptido EKAHDGGR↓. Estos marcadores se localizan en los telopéptidos de colágeno tipo I y no en la parte interna (la parte helicoidal triple) del colágeno tipo I. Los anticuerpos monoclonales empleados para el ensayo PINP se elevaron contra un epítipo interno en la secuencia PINP que no es neo-epítipo.

35

40

Møller S y otros, Gut., 1999⁹⁹ demostraron que el telopéptido reticulado C-terminal del colágeno de tipo I (ICTP) se elevó en los pacientes con cirrosis alcohólica en comparación con los controles. El estudio que se describió demostró que un marcador bioquímico puede reflejar la fibrosis hepática. El anticuerpo policlonal ICTP se indujo contra el colágeno tipo I que se clivó por la tripsina y la colagenasa. Sin embargo, los anticuerpos no se unen a un neo-epítipo.

45

Rosen HN y otros, Calcif Tissue Int, 2004¹⁰⁰ evaluaron los marcadores de recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX) y C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) en mujeres que reciben el tratamiento de reemplazo hormonal (HRT). En el estudio se observó que los marcadores de recambio óseo disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos empleados en el NTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y dependen del neopéptido JYDGKGVG↓. Los anticuerpos empleados en el CTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el extremo C del colágeno tipo I y dependen del neopéptido EKAHDGGR↓. En contraste con la presente invención, estos anticuerpos se usaron para la evaluación del metabolismo óseo y no la fibrosis.

50

55

Lein M y otros, Eur Urol, 2007¹⁰¹ evaluaron el uso de los marcadores de recambio óseo N-telopéptido del colágeno tipo I (NTX) y C-telopéptido del colágeno tipo I (CTX) específicos para el neo-epítipo en pacientes con cáncer de próstata que reciben ácido zoledrónico. En el estudio se observó que los marcadores de recambio óseo disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos empleados en el NTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el N-terminal del colágeno tipo I y dependen del neopéptido JYDGKGVG↓. Los anticuerpos empleados en el CTX se elevaron contra a un sitio escindido por catepsina K en el extremo C del colágeno tipo I y dependen del neopéptido EKAHDGGR↓. En contraste con la presente invención, estos anticuerpos se usaron para la evaluación del metabolismo óseo durante la invasión de metástasis ósea y no fibrosis.

60

El PIIINP se usó en una serie de estudios para evaluar la gravedad de la enfermedad fibrótica¹⁰², en pacientes con fibrosis de la piel seguido de un trauma por quemadura severo¹⁰³, para la progresión de la enfermedad en cirrosis biliar primaria no cirrótica¹⁰⁴, en la cirrosis biliar primaria y la hepatitis viral C crónica¹⁰⁵.

65

El PIIINP y el ICTP se midieron en los pacientes con fibrosis del miocardio ¹⁰⁶.

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

Sin embargo, en ninguno de los informes mencionados anteriormente se sugiere que las mediciones de fragmentos peptídicos basados en anticuerpos que se unen a neo-epítomos tal como se reivindican ahora podrían ser útiles para la evaluación de pacientes con enfermedad fibrótica. El documento WO2009/059972 publicado el 14 de mayo de 2009 (después de la fecha de prioridad de esta) describe ensayos para neoepítomos de colágeno III, pero no revela que un nivel elevado de tal medida esté asociado con la presencia o extensión de fibrosis.

La presente invención incluye un método de inmunoensayo para medir fragmentos de proteína que contienen neo-epítomos naturalmente presentes en la muestra de fluido corporal, en donde dicho inmunoensayo se lleva a cabo mediante un método que comprende:

contactar fragmentos de proteína naturalmente presentes en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica reactiva con un neo-epítomo N-terminal formado por escisión de una proteína por una proteinasa o un neo-epítomo C-terminal formado por escisión de una proteína por una proteinasa, cuya pareja de unión inmunológica es no reactiva con la proteína intacta a partir de la cual se deriva el epítomo y es no reactiva con una versión prolongada de la secuencia del neo-epítomo en la que la secuencia del neo-epítomo se prolonga más allá del sitio de escisión, y medir la extensión de la unión de los fragmentos de péptidos a dicha pareja de unión inmunológica para medir los fragmentos de proteína que comprenden dicho neo-epítomo, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítomo constituido por una secuencia de aminoácido N-terminal presente en péptidos producidos por escisión de colágeno tipo I, dichos péptidos comprenden una secuencia N-terminal seleccionada del grupo que consiste en:

Colágeno I, alfa 1		
ISVPGP...sec. con núm. de ident.:23	VPGPMG... sec. con núm. de ident.:24	PGPMGP... sec. con núm. de ident.:25
FQGPPG... sec. con núm. de ident.:27	KNGDDG... sec. con núm. de ident.:28	ARGLPG... sec. con núm. de ident.:29
LDGAKG... sec. con núm. de ident.:31	LPGERG... sec. con núm. de ident.:32	ATGAAG... sec. con núm. de ident.:67
VRGEPG... sec. con núm. de ident.:33	PGAKGA... sec. con núm. de ident.:34	GIAGAP... sec. con núm. de ident.:69
GGPPGP... sec. con núm. de ident.:35	NSGEPG... sec. con núm. de ident.:36	VQGPPG... sec. con núm. de ident.:71
DGVAGP... sec. con núm. de ident.:37	ERGSPG... sec. con núm. de ident.:38	RGSPGP... sec. con núm. de ident.:74
LTGSPG... sec. con núm. de ident.:39	QDGRPG... sec. con núm. de ident.:40	ARGQAG... sec. con núm. de ident.:77
RGVPGP...sec. con núm. de ident.:41	VGPAGK...sec. con núm. de ident.:42	KDGEAG...sec. con núm. de ident.:80
ERGEQG...sec. con núm. de ident.:43	RGEQGP...sec. con núm. de ident.:44	QGLPGP...Sec. con núm de ident.:83
PGERGV...Sec. con núm de ident.:45	ANGAPG...Sec. con núm de ident.:46	AGLPGP...Sec. con núm de ident.:86
ARGAPG...Sec. con núm de ident.:47	PGDRGE...Sec. con núm de ident.:48	FAGPPG...Sec. con núm de ident.:75
AKGDAG...Sec. con núm de ident.:49	PIGNVG...Sec. con núm de ident.:50	NVGAPG...Sec. con núm de ident.:78
AAGRVG...Sec. con núm de ident.:51	PPGPAG...Sec. con núm de ident.:52	GEVPPP...Sec. con núm de ident.:81

5	GADGPA...Sec. con núm de ident.:53	GPQGIA...Sec. con núm de ident.:54	IAGQRG...Sec. con núm de ident.:84
	GQRGVV...Sec. con núm de ident.:55	QRGVVG...Sec. con núm de ident.:56	RGVVGL...Sec. con núm de ident.:87
10	GLPGQR...Sec. con núm de ident.:57	PGLPGP...Sec. con núm de ident.:58	EPGKQG...Sec. con núm de ident.:90
	PMGPPG...Sec. con núm de ident.:59	MGPPGL...Sec. con núm de ident.:60	LAGPPG...Sec. con núm de ident.:89
15	DKGETG...Sec. con núm de ident.:61	LQPPG...Sec. con núm de ident.:62	PSGASG...Sec. con núm de ident.:92
	SAGAPG...Sec. con núm de ident.:63	RTGDAG...Sec. con núm de ident.:64	VGPPGP...Sec. con núm de ident.:99
20	FDFSF...Sec. con núm de ident.:65	DFSF...Sec. con núm de ident.:66	AGQRGV...Sec. con núm de ident.:95
	LPGPGG...Sec. con núm de ident.:26	QAGVMG...Sec. con núm de ident.:76	VVGLPG...Sec. con núm de ident.:98
25	SGLDGA...Sec. con núm de ident.:30	PAGERG...Sec. con núm de ident.:79	GKQGPS...Sec. con núm de ident.:93
	AKGEAG...Sec. con núm de ident.:68	ARGERG...Sec. con núm de ident.:82	ARGPAG...Sec. con núm de ident.:96
30	IAGAPG...Sec. con núm de ident.:70	LTGPIG...Sec. con núm de ident.:85	ASGPAG...Sec. con núm de ident.:97
	LPGPPG...Sec. con núm de ident.:72	AGPPGA...Sec. con núm de ident.:88	GPPGPP...Sec. con núm de ident.:100
35	AGPKGS...Sec. con núm de ident.:73	ATGFPG...Sec. con núm de ident.:91	
		GPPGPA...Sec. con núm de ident.:94	

40

o en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constituido por una secuencia de aminoácidos C-terminal presente en los péptidos que se producen por escisión del colágeno tipo III, dichos péptidos comprenden una secuencia C-terminal que se selecciona del grupo que consiste en:

45

Colágeno I, alfa 1			
50	...QLSYGY sec. con núm. de ident.:101	...EKSTGG sec. con núm. de ident.: 102	...PPGPQG sec. con núm. de ident.:103
	...KGHRGF sec. con núm. de ident.:104	...PSGPRG sec. con núm. de ident.:105	...APGPQG sec. con núm. de ident.:106
	...APGPAG sec. con núm. de ident.:107	...FPGAVG sec. con núm. de ident.:108	...SEGPQG sec. con núm. de ident.:109
55	...GANGAP sec. con núm. de ident.:110	...ANGAPG sec. con núm. de ident.:46	...SGPQGP sec. con núm. de ident.:112
	...EPGPVG sec. con núm. de ident.:113	...EPGPTG sec. con núm. de ident.:114	...RGFPGA sec. con núm. de ident.:115
60	...KGPAGE sec. con núm. de ident.:116	...RGSPGP sec. con núm. de ident.:74	...LPGAKG sec. con núm. de ident.:118
	...AVGPAG sec. con núm. de ident.:122	...PPGARG sec. con núm. de ident.:120	...PGKAGE sec. con núm. de ident.:121

65

5	...APGPDG sec. con núm. de ident.:125	...PAGPAG sec. con núm. de ident.:123	...AGPAGE sec. con núm. de ident.:124
	...KDGVRG sec. con núm. de ident.:128	...RGERGF sec. con núm. de ident.:126	...PAGPRG sec. con núm. de ident.:127
10	...PGPAGF sec. con núm. de ident.:131	...PAGPTG sec. con núm. de ident.:129	...TGARGA sec. con núm. de ident.:130
	...SAGPPG sec. con núm. de ident.:134	...EPGDAG sec. con núm. de ident.:132	...PAGPPG sec. con núm. de ident.:133
15	...GEVGPP sec. con núm. de ident.:81	...ATGFPG sec. con núm. de ident.:91	...NAGPPG sec. con núm. de ident.:136
	...PGPQGI sec. con núm. de ident.:140	...GEKGSP SEQ ID 138	...GAPGTP sec. con núm. de ident.:139
20	...IAGQRG sec. con núm. de ident.:84	...GPQGIA sec. con núm. de ident.:54	...PQGIAG sec. con núm. de ident.:142
	...GPSGEP sec. con núm. de ident.:146	...GQRGVV sec. con núm. de ident.:55	...RGERGF sec. con núm. de ident.:126
25	...PVGPPG sec. con núm. de ident.:149	...ERGPPG sec. con núm. de ident.:147	...RGPPGP sec. con núm. de ident.:148
	...EQGPSG sec. con núm. de ident.:152	...PQGPRG SEQ ID 150	...HRGFSG sec. con núm. de ident.:151
30	...GPPGPP sec. con núm. de ident.:100	...PRGPPG sec. con núm. de ident.:153	...PPGPRG sec. con núm. de ident.:154
	...PPGPPG sec. con núm. de ident.:119	...GPPSAG sec. con núm. de ident.:156	...PPSAGF sec. con núm. de ident.:157
35	...QMGPARG sec. con núm. de ident.:161	...PPGPAG sec. con núm. de ident.:52	...TPGPQG sec. con núm. de ident.:160
	...PGADGQ sec. con núm. de ident.:164	...PGPPGA SEQ ID 162	...QGIAGQ SEQ ID 163
40	...PPGPKG sec. con núm. de ident.:167	...AGSPGF sec. con núm. de ident.:165	...LPGPSG sec. con núm. de ident.:166
	...PKGARG sec. con núm. de ident.:170	...PGERGA sec. con núm. de ident.:168	...PMGPPG sec. con núm. de ident.:59
45	...GPARGP sec. con núm. de ident.:173	...PPGPIG sec. con núm. de ident.:174	...SPGEQG sec. con núm. de ident.:172
	...TGDAGP sec. con núm. de ident.:175		

50

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

55

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

60

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

65

Colágeno tipo I

Determinamos que las enzimas que se enumeran en la siguiente tabla escinden el colágeno tipo I en al menos los siguientes sitios de escisión (marcados "."):

5 Tabla 8. Sitios de escisión Colágeno tipo I.

Proteasa	Colágeno tipo I
10 MMP-2	V.PGPMG P SGPRGLPG P PGAPGPQ G .F sec. con núm. de ident.:4
MMP-2	S.VPGPMG P SGPRGLPG P PGAPGPQ G .F sec. con núm. de ident.:5
MMP-2	G.ISVPG M SGPRGLPG P PGAPGPQ G .F sec. con núm. de ident.:6
15 MMP-9	G.ISVPGPMG P SGPRGLPG P PGAPGPQ G .F sec. con núm. de ident.:6
MMP-13	G.FQG P PGEPGEPGASGPMGPRG P PG P PG.K sec. con núm. de ident.:7
MMP-13	V.PG M SGPRGLPG P PGAPGPQ G .F sec. con núm. de ident.:8
20 MMP-2	F.SGLD G AKGDAGPAG P K G EPGSPG E NGAP G QMGP R G.L sec. con núm. de ident.:9
MMP-9	F.SGLD G AKGDAGPAG P K G EPGSPG E NGAP G QMGP R G.L sec. con núm. de ident.:9
MMP-13	F.SGLD G AKGDAGPAG P K G EPGSPG E NGAP G QMGP R G.L sec. con núm. de ident.:9
MMP-9	G.LPGERGRPGAP G PAG.A sec. con núm. de ident.:10
25 MMP-13	G.LPGERGRPGAP G PAG.A sec. con núm. de ident.:10
MMP-2	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AG.Q sec. con núm. de ident.:11
MMP-2	E.RGSP G PAG P KGS P GEAGR P GEAGL P GAK G .L sec. con núm. de ident.:12
30 MMP-2	G.ERGSP G PAG P KGS P GEAGR P GEAGL P GAK G .L sec. con núm. de ident.:13
MMP-9	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AG.Q sec. con núm. de ident.:14
MMP-9	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AGQDGRPG P PG P AG.A sec. con núm. de ident.:15
35 MMP-9	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AGQDGRPG P PG P AGARG.Q sec. con núm. de ident.:16
MMP-13	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AG.Q sec. con núm. de ident.:14
MMP-13	G.ERGSP G PAG P KGS P GEAGR P GEAGL P GAK G .L sec. con núm. de ident.:13
40 MMP-9	G.QDGRPG P PG P AGARG.Q sec. con núm. de ident.:17
MMP-9	G.LTGSP G SPGDGKTG P PG P AGQDGRPG P PG P AGARG.Q sec. con núm. de ident.:18
MMP-2	G.KDGEAG A Q G P P AG P AGERGEQ G PAGSP G F.Q sec. con núm. de ident.:19
MMP-2	G.ERGEQ G PAGSP G F.Q sec. con núm. de ident.:20
45 MMP-3	E.RGV P PG P AVGPAGKDGEAG A Q G P P AG P AGERGEQ G PAGSP G F.Q sec. con núm. de ident.:21
MMP-8	E.RGV P PG P AVGPAGKDGEAG A Q G P P AG P AGERGEQ G PAGSP G F.Q sec. con núm. de ident.:21
50 -	113 PKGDTGPRGP.122 sec. con núm. de ident.:22
	<u>P</u> indica hidroxiprolina, <u>M</u> indica metionina oxidada, y <u>K</u> indica hidroxilisina.

La pareja de unión inmunológica puede ser una reactiva específicamente con un neoepítipo C-terminal o N-terminal que se forma por escisión del colágeno de tipo I, excluyendo la escisión en el sitio del colágeno tipo I de la captasina K.

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

Tabla 9. Secuencias N-terminal de fragmentos peptídicos generados por proteasa de Colágeno tipo I. (El símbolo '.' indica el sitio de escisión)

ES 2 635 494 T3

Colágeno I, alfa 1			
5	.ISVPGP sec. con núm. de ident.:23	.VPGPMG sec. con núm. de ident.:24	.PGPMGP sec. con núm. de ident.:25
	.LPGPPG sec. con núm. de ident.:26	.FQGPPG sec. con núm. de ident.:27	.KNGDDG sec. con núm. de ident.:28
10	.ARGLPG sec. con núm. de ident.:29	.SGLDGA sec. con núm. de ident.:30	.LDGAKG sec. con núm. de ident.:31
	.LPGERG sec. con núm. de ident.:32	.VRGEPG sec. con núm. de ident.:33	.PGAKGA sec. con núm. de ident.:34
15	.GGPPGP sec. con núm. de ident.:35	.NSGEPG sec. con núm. de ident.:36	.DGVAGP sec. con núm. de ident.:37
	.ERGSPG sec. con núm. de ident.:38	.LTGSPG sec. con núm. de ident.:39	.QDGRPG sec. con núm. de ident.:40
20	.RGVPGP sec. con núm. de ident.:41	.VGPAGK sec. con núm. de ident.:42	.ERGEQG sec. con núm. de ident.:43
	.RGEQGP sec. con núm. de ident.:44	.PGERGV sec. con núm. de ident.:45	.ANGAPG sec. con núm. de ident.:46
25	.ARGAPG sec. con núm. de ident.:47	.PGDRGE sec. con núm. de ident.:48	.AKGDAG sec. con núm. de ident.:49
	.PIGNVG sec. con núm. de ident.:50	.AAGRVG sec. con núm. de ident.:51	.PPGPAG sec. con núm. de ident.:52
30	.GADGPA sec. con núm. de ident.:53	.GPQGIA sec. con núm. de ident.:54	.QQRGVV sec. con núm. de ident.:55
	.QRGWG sec. con núm. de ident.:56	.GLPGQR sec. con núm. de ident.:57	.PGLPGP sec. con núm. de ident.:58
35	.PMGPPG sec. con núm. de ident.:59	.MGPPGL sec. con núm. de ident.:60	.DKGETG sec. con núm. de ident.:61
	.LQGPPG sec. con núm. de ident.:62	.SAGAPG sec. con núm. de ident.:63	.RTGDAG sec. con núm. de ident.:64
40	.FDFSF sec. con núm. de ident.:65	.DFSF sec. con núm. de ident.:66	.ATGAAG sec. con núm. de ident.:67
	.AKGEAG sec. con núm. de ident.:68	.GIAGAP sec. con núm. de ident.:69	.IAGAPG sec. con núm. de ident.:70
45	.VQGPPG sec. con núm. de ident.:71	.LPGPPG sec. con núm. de ident.:72	.AGPKGS sec. con núm. de ident.:73
	.RGSPGP sec. con núm. de ident.:74	.FAGPPG sec. con núm. de ident.:75	.QAGVMG sec. con núm. de ident.:76
50	.ARGQAG sec. con núm. de ident.:77	.NVGAPG sec. con núm. de ident.:78	.PAGERG sec. con núm. de ident.:79
	.KDGEAG sec. con núm. de ident.:80	.GEVGPP sec. con núm. de ident.:81	.ARGERG sec. con núm. de ident.:82
55	.QGLPGP sec. con núm. de ident.:83	.IAGQRG sec. con núm. de ident.:84	.LTGPIG sec. con núm. de ident.:85
	.AGLPGP sec. con núm. de ident.:86	.RGVVGL sec. con núm. de ident.:87	.AGPPGA sec. con núm. de ident.:88
60	.LAGPPG sec. con núm. de ident.:89	.EPGKQG sec. con núm. de ident.:90	.ATGFPG sec. con núm. de ident.:91
	.PSGASG sec. con núm. de ident.:92	.GKQGPS sec. con núm. de ident.:93	.GPPGPA sec. con núm. de ident.:94
65			

5	.AGQRGV sec. con núm. de ident.:95	.ARGPAG sec. con núm. de ident.:96	.ASGPAG sec. con núm. de ident.:97
	.VVGLPG sec. con núm. de ident.:98	.VGPPGP sec. con núm. de ident.:99	.GPPGPP sec. con núm. de ident.:100
10	.TGDAGP sec. con núm. de ident.:175		

Alternativamente, las parejas de unión inmunológica adecuadas pueden ser específicamente reactivas con cualquiera de las siguientes secuencias en el C terminal de un péptido:

Tabla 10. Secuencias de proteasa en el C-terminal de fragmentos peptídicos generados por proteasa of Colágeno tipo I (El símbolo '!' indica el sitio de escisión).

Colágeno I, alfa 1			
20	QLSYGY.sec. con núm. de ident.:101	EKSTGG.sec. con núm. de ident.:102	PPGPQG.sec. con núm. de ident.:103
25	KGHRGF.sec. con núm. de ident.:104	PSGPRG.sec. con núm. de ident.:105	APGPQG.sec. con núm. de ident.:106
	APGPAG.sec. con núm. de ident.:107	FPGAVG.sec. con núm. de ident.:108	SEGPQG.sec. con núm. de ident.:109
30	GANGAP.sec. con núm. de ident.:110	ANGAPG. Sec. con núm de ident.:46	SGPQGP.sec. con núm. de ident.:112
	EPGPVG.sec. con núm. de ident.:113	EPGPTG.sec. con núm. de ident.:114	RGFPGA.sec. con núm. de ident.:115
35	KGPAGE.sec. con núm. de ident.:116	RGSPGP.sec. con núm. de ident.:74	LPGAKG.sec. con núm. de ident.:118
	PPGPPG.sec. con núm. de ident.:119	PPGARG.sec. con núm. de ident.:120	PGKAGE.sec. con núm. de ident.:121
40	AVGPAG.sec. con núm. de ident.:122	PAGPAG.sec. con núm. de ident.:123	AGPAGE.sec. con núm. de ident.:124
	APGPDG.sec. con núm. de ident.:125	RGERGF.sec. con núm. de ident.:126	PAGPRG.sec. con núm. de ident.:127
45	KDGVRG.sec. con núm. de ident.:128	PAGPTG.sec. con núm. de ident.:129	TGARGA.sec. con núm. de ident.:130
	PGPAGF.sec. con núm. de ident.:131	EPGDAG.sec. con núm. de ident.:132	PAGPPG.sec. con núm. de ident.:133
50	SAGPPG.sec. con núm. de ident.:134	ATGFPG.sec. con núm de ident.:91	NAGPPG.sec. con núm. de ident.:136
	GEVGPP.sec. con núm de ident.:81	GEKGSP.sec. con núm. de ident.:138	GAPGTP.sec. con núm. de ident.:139
55	PGPQGI.sec. con núm. de ident.:140	GPQGIAG.sec. con núm de ident.:54	PQGIAG.sec. con núm. de ident.:142
	IAGQRG.sec. con núm. de ident.:4	GQRGVV.sec. con núm de ident.:55	
60	GPSGEP.sec. con núm. de ident.:146	ERGPPG.sec. con núm. de ident.:147	RGPPGP.sec. con núm. de ident.:148
	PVGPVG.sec. con núm. de ident.:149	PQGPRG.sec. con núm. de ident.:150	HRGFSG.sec. con núm. de ident.:151

5	EQGPSG.sec. con núm. de ident.:152	PRGPPG.sec. con núm. de ident.:153	PPGPRG.sec. con núm. de ident.:154
	GPPGPP.sec. con núm de ident.:100	GPPSAG.sec. con núm. de ident.:156	PPSAGF.sec. con núm. de ident.:157
10		PPGPAG.sec. con núm de ident.:52	TPGPQG.sec. con núm. de ident.:160
	QMGPARG.sec. con núm. de ident.:161	PGPPGA.sec. con núm. de ident.:162	QGIAGQ.sec. con núm. de ident.:163
15	PGADGQ.sec. con núm. de ident.:164	AGSPGF.sec. con núm. de ident.:165	LPGPSG.sec. con núm. de ident.:166
	PPGPKG.sec. con núm. de ident.:167	PGERGA.sec. con núm. de ident.:168	PMGPPG.sec. con núm de ident.:59
20	PKGPAG.sec. con núm. de ident.:170	GRNGDP.sec. con núm. de ident.:171	SPGEQG.sec. con núm. de ident.:172
	GPAGRP.sec. con núm. de ident.:173	PPGPIG.sec. con núm. de ident.:174	TGDAGP.sec. con núm. de ident.:175
25	TGPRGP.sec. con núm. de ident.:177		

Además, los ensayos se pueden basar en los neo-epítomos generados adyacente a los sitios de escisión ilustrados, es decir, en las secuencias C-terminal que conducen a los epítomos N-terminal que se indican anteriormente y las secuencias N-terminal que se conectan con los epítomos C-terminales descritos.

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

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

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

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

Un método adecuado podría ser un inmunoensayo de competencia usando anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a anticuerpos que se unen a neo-epítomos de colágeno tipo I. Los péptidos sintéticos apropiadamente seleccionados revestidos sobre la superficie sólida de una placa de microtitulación podrían competir con la muestra para unirse a los anticuerpos monoclonales o Fragmentos de unión. Alternativamente, los fragmentos de colágeno de tipo I nativos, purificados, que portan el neo-epítomo que se reconoce por el anticuerpo monoclonal o por el fragmento de unión se podrían usar en la superficie sólida. Aún otra alternativa es inmovilizar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión en la superficie sólida y después co-incubar la muestra con un péptido sintético que se unió apropiadamente a una molécula de señal, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante o la biotina.

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

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

En ciertos métodos que se prefieren el método comprende además comparar el nivel que se determinó de dicha unión de dichos fragmentos peptídicos con los valores característicos de (a) individuos sanos comparables y/o (b) una

condición fibrótica patológica y asociar opcionalmente un nivel más alto del péptido que se midió (normalmente indicado por un mayor nivel de unión) con un grado más grave de dicha condición.

5 La presente descripción se refiere al desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen neo-epítopes como se describió anteriormente. Esto puede alcanzarse mediante la inmunización de ratones con péptidos sintéticos procedentes de la secuencia de aminoácidos de colágeno tipo I (que incluye las secuencias enumeradas anteriormente o las secuencias que terminan en las mismas), por la fusión de las células del bazo de ratones seleccionados a las células de mieloma, y mediante la comprobación los anticuerpos monoclonales para la unión a neo-epítos en los péptidos sintéticos correspondientes. La especificidad por los neo-epítos se puede asegurar al exigir la reactividad con un péptido sintético y una falta de reactividad con ya sea una forma C-prolongada del péptido inmunizante (para un neo-epítos C-terminal) o una forma N-terminal prolongada del péptido inmunizante (para un neo-epítos N-terminal). Los anticuerpos para neo-epítos también pueden evaluarse para establecer una falta de la capacidad de unión al colágeno tipo I nativo. Alternativamente, la especificidad por un neo-epítos se puede asegurar al exigir que la reactividad del anticuerpo sea negativamente dependiente de la presencia de biotina o de otros grupos funcionales que se unen covalentemente a uno de los aminoácidos terminales.

En la presente se describe una pareja de unión inmunológica que es específicamente inmunorreactiva con un neo-epítos que se forma por escisión del colágeno tipo I por una proteasa en un sitio terminal en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo I expuesto anteriormente, y puede ser por ejemplo un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo.

En la presente se describe además una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal contra un neo-epítos C-terminal o N-terminal que se forma por escisión del colágeno tipo I en los sitios terminales de las secuencias en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo I expuestas anteriormente.

La presente descripción proporciona además un péptido que comprende un neo-epítos C-terminal o N-terminal que se forma por escisión del colágeno de tipo I en cualquiera de las secuencias parciales expuestas anteriormente. Tal péptido puede conjugarse como un hapteno a un portador para producir una respuesta inmune a dicho péptido, o inmovilizarse a una superficie sólida o conjugarse con un marcador detectable para su uso en un inmunoensayo.

La presente descripción proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un péptido que comprenda un neo-epítos C-terminal o N-terminal que se forma por escisión del colágeno tipo I en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo I expuestas anteriormente.

La presente descripción proporciona además un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una señal de expresión y una secuencia codificante que codifica para la expresión de un péptido que comprende un neo-epítos C-terminal o N-terminal que se forma por escisión del colágeno tipo I en cualquiera de las secuencias parciales del colágeno tipo I expuestas anteriormente e incluye además una célula huésped transformada con un vector de este tipo y que expresa dicho péptido.

Todavía otro aspecto de la presente descripción se refiere a estuches, que pueden usarse convenientemente para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente. Tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con el péptido sintético; (2) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión de anticuerpo de la invención reactivo con dicho péptido sintético; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con fragmentos de colágeno tipo I nativos purificados; (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítos en los fragmentos del colágeno tipo I y que sea reactivo con dichos fragmentos del colágeno de tipo I purificados; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, tales estuches pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético que se une a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítos en el colágeno tipo I y que sea reactivo con dicho péptido sintético; y (4) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Aún otra alternativa podría ser estuches que incluyen (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético que se une a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítos en el colágeno de tipo I (y que sea reactivo con dicho péptido sintético) y conjugado con peroxidasa de rábano picante.

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

Los ensayos descritos en la presente descripción son útiles en el diagnóstico de la fibrosis en pacientes. Adicionalmente, los ensayos son útiles para la evaluación de la progresión de la enfermedad, y la supervisión de la respuesta a la terapia. Las parejas de unión inmunológica descritas en la presente descripción pueden usarse además en la inmunotinción para mostrar la presencia o localización de los productos del escisión del colágeno de tipo I.

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

- 5 La Figura 1 muestra un gráfico con los resultados de ELISA para el C03 de diferentes muestras biológicas: Muestras de suero humano agrupadas (suero); Fluido amniótico humano (AF); medio de cultivo de fibroblastos humanos (Fibr.Cltr.); La Figura 2a muestra un gráfico que muestra los niveles séricos del C03 en ratas con operación(es) simulada(s) y con el conducto biliar ligado al inicio del estudio (b) y en la terminación (t);
- 10 La Figura 2b muestra los valores delta correspondientes de C03 en suero de rata: Niveles de terminación - Niveles de los valores iniciales;
- La Figura 3 muestra un gráfico que muestra los niveles de CO3 en diferentes muestras de suero humano. Suero normal: de individuos sanos. COPD: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (que conduce a la fibrosis pulmonar). Esclerodermia (que conduce a la fibrosis de la piel y pulmonar). HCV: Virus de la Hepatitis C (que conduce a la fibrosis hepática);
- 15 La Figura 4 muestra los pesos del Hígado y las puntuaciones del Hígado que se determinan en el Ejemplo 5;
- La Figura 5 muestra los niveles de los fragmentos de escisión con MMP-9 del colágeno Tipo III que se midieron de acuerdo con la invención en el Ejemplo 5;
- La Figura 6 muestra los niveles de expresión génica del colágeno Tipo III en BDL o ratas con operación simulada que se determinan en el Ejemplo 5;
- 20 La Figura 7 muestra los cambios de los niveles de expresión del fragmento del escisión con MMP-9 del colágeno Tipo III reactivo con el anticuerpo que se utilizó en el Ejemplo 5 como se determina por Western blot;
- La Figura 8 muestra los resultados de la tinción histológica de las secciones del hígado que se obtienen en el Ejemplo 5;
- La Figura 9 muestra las correlaciones entre las mediciones de los fragmentos del colágeno Tipo III de acuerdo con la invención con otros biomarcadores del hígado como se determinan en el Ejemplo 5;
- 25 La Figura 10 muestra los resultados que se obtienen en las muestras de suero humano en el Ejemplo 6; y
- La Figura 11 muestra los resultados que se obtienen en la prueba de la reactividad de un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo N-terminal de la CRP.
- La Figura 12 muestra la acumulación de colágeno en el hígado de rata que se mide en el Ejemplo 8.
- La Figura 13 muestra los resultados del inmunoensayo que se obtienen en el Ejemplo 8.
- 30 La Figura 14 muestra la correlación de los resultados del inmunoensayo de la Figura 13 con el contenido de colágeno hepático.
- La Figura 15 muestra una comparación de los resultados de un inmunoensayo de acuerdo con la invención con las mediciones de ácido hialurónico y de la tinción con rojo Sirio en el Ejemplo 8.
- 35 La Figura 16 muestra en el primer panel la correlación de los resultados del inmunoensayo de acuerdo con la invención con la tinción con rojo Sirio y en el segundo panel de la correlación entre los niveles de ácido hialurónico y la tinción con rojo Sirio.
- La Figura 17 muestra la falta de correlación entre los resultados del inmunoensayo de la invención y los niveles de ácido hialurónico.
- 40 La Figura 18 muestra las secciones de piel y las mediciones del grosor de la piel que se describen en el Ejemplo 9.
- La Figura 19 muestra los resultados de un inmunoensayo de acuerdo con la invención en el Ejemplo 9.
- La Figura 20 muestra en el panel A imágenes de Western Blot que se obtuvieron en el Ejemplo 9 y en el panel B los resultados del inmunoensayo correspondientes de acuerdo con la invención.
- La Figura 21 muestra una correlación entre los resultados del inmunoensayo y las mediciones del grosor de la piel.
- 45 La Figura 22 muestra una correlación entre los resultados del inmunoensayo de orina y las mediciones de Western blot que se describen en el Ejemplo 9.

Ejemplo 1: Colágeno tipo III degradado con MMP-9

Método

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

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

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

realizaron mediante el cultivo y la re-siembra de las células de las quimeras supervivientes en clones de células individuales. Los clones se seleccionan por selección y desección de péptidos, seguidos por pruebas de reactividad nativa (Figura 1), ya que los neoepítomos se generan por secuencias peptídicas pequeñas sintéticas, que pueden no reflejar las proteínas nativas. Un clon de subtipo IgG se seleccionó para la producción de anticuerpos. La purificación de anticuerpos se realiza mediante una columna de proteína-G.

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

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

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

Ejemplo 2: CO3 en muestras biológicas relevantes: Niveles del CO3 en las ratas con el conducto biliar ligado en comparación con las ratas con operación simulada.

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

La fibrosis hepática se indujo por BDL común. En resumen: La rata se anestesió, se encontró el conducto biliar, se realizaron dos ligaduras alrededor de la vía biliar seguido de la disección entre las ligaduras, se cerró el abdomen. En ratas con operación simulada, el abdomen se cerró sin la ligadura del conducto biliar. Las ratas se dividieron en 2 grupos: Grupo 1 (10 ratas con operación BDL y 10 con operación simulada) se sacrificaron después de 2 semanas, y el Grupo 2 (9 ratas con operación BDL y 10 con operación simulada) se sacrificaron después de 4 semanas. Al finalizar el período de estudio (2, o 4 semanas), después de al menos 14 horas de ayuno, todos los animales supervivientes fueron asfixiados con CO₂ y se sacrificaron por desangrado.

Las muestras de sangre se tomaron del seno retro-orbital de ratas con al menos 14 horas de ayuno bajo anestesia ligera con CO₂/O₂ al inicio y a la terminación. La sangre se colectó y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente para su coagulación, lo que se siguió por una centrifugación a 1500 g durante 10 minutos. Todos los líquidos libres de coágulos se transfirieron a nuevos tubos y se centrifugaron de nuevo a 1500 g durante 10 minutos. El suero se transfirió a tubos limpios y se almacenó a -80 °C.

Los niveles de CO3 se midieron en x 5 muestras de suero diluido de las ratas. Los niveles en BDL y Simulada se compararon mediante la prueba Mann-Whitney de dos colas no paramétrica ($\alpha = 0.05$) de significación estadística suponiendo una distribución normal.

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

Ejemplo 3:

CO3 en diferentes enfermedades fibróticas (suero humano)

Los niveles de CO3 se midieron en suero de humanos con tres enfermedades fibróticas diferentes: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), esclerodermia y virus de la hepatitis C (HCV). Las muestras de suero se recuperaron de Sera Laboratories International Ltd (SLI Ltd), Reino Unido.

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

Ejemplo 4:

Desarrollo de anticuerpos - detección del marcador CO3-610C

El colágeno tipo III (Abcam, Cambridge, Reino Unido) se degradó in vitro por la MMP-9 activada (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 2 días. Los fragmentos de degradación se secuenciaron por LS-MS/MS y se identificaron mediante la búsqueda en el MASCOT. Una secuencia peptídica específica ⁶¹⁰KNGETGPQ se seleccionó para la

producción del anticuerpo. El N-terminal de esta secuencia es el residuo 610 del colágeno humano tipo III. El péptido sintético se conjugó con la ovoalbúmina antes de la inmunización subcutánea de los ratones Balb/C de 4-6 semanas de edad con aproximadamente 200µL de antígeno emulsificado y 50µg del CO3-610C (KNGETGPQGGC-OVA). Las inmunizaciones consecutivas se realizaron a intervalos de dos semanas en adyuvante incompleto de Freund hasta que se alcanzaron niveles de titulación de suero estables. Los ratones se sangraron de la segunda inmunización en lo adelante. En cada sangrado, se midió el título del suero y el ratón con el mayor título de anti-suero se seleccionó para la fusión. Después de la cuarta inmunización, este ratón descansó durante un mes y después se le dio una dosis de refuerzo por vía intravenosa con 50 µg del CO3-610C en 100 µl de solución de cloruro sódico al 0.9 % tres días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

Los clones productores de los anticuerpos monoclonales se seleccionaron mediante el uso de a) un péptido inmunogénico: KNGETGPQGP-GGC-Ovalbúmina (OVA) (807678), b) un péptido de tamizaje KNGETGPQGP-PG-K-Biotina (807971), c) los péptidos de deselección KDGETGAAGPPGK-Biotina (118318) que representa una cadena alfa 1 de colágeno tipo II, KDGEAGAQGPPGK-Biotina que representa un producto de la degradación de la cadena alfa 1 del colágeno tipo I, comprados a la Chinese Peptide Company, Beijing, China. La placa de ELISA recubierta se obtuvo de NUNC (Thermofisher, Copenhagen, Dinamarca). Los reactivos de conjugación de péptidos y los tampones se produjeron por Pierce (Thermofisher, Copenhagen, Dinamarca).

El tampón usado para disolver el péptido de recubrimiento estaba compuesto de lo siguiente: 40 mM Na₂HPO₄, 12 H₂O, 7 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, 1 % BSA, 10 % sorbitol, pH 7. Para un ensayo de suero, se usó tampón que contenía los siguientes productos químicos: 8 mM Na₂HPO₄, 12 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, 13,7 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 % Tween 20, 1 % BSA, 0,003 % fenol rojo, pH 7.4. Un tampón diferente que se usó para un ensayo de orina contenía Trizma 400 mM, 0,05% de Tween 20, 0,1% de BSA, 0,36% de Bronidox L5, pH 8.0. Tanto para el ensayo de suero como el de orina se usó un tampón de lavado compuesto por Trizma 25 mM, NaCl 50 mM, 0,036% de Bronidox L5, 0,1% de Tween 20, y tampón de parada de la reacción compuesto por 0,1 % de H₂SO₄. Las placas de ELISA que se usaron para el desarrollo del ensayo se recubrieron con Estreptavidina de Roche (Hvidovre, Dinamarca) cat.:11940279. Todas las placas de ELISA se analizaron con el lector de ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA Estados Unidos).

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

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

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

Ejemplo 5

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

Animales

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

Diseño del Estudio

En 20 ratas, la fibrosis hepática se indujo mediante BDL común. El procedimiento quirúrgico se realizó en condiciones estériles. La rata se anestesió, el conducto biliar se localizó y se ligó en dos lugares seguido por la disección entre las ligaduras, y se cerró el abdomen. Las otras 20 ratas se sometieron a una operación simulada, en la que el abdomen se

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

5

Muestreo de sangre

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

10

Manipulación de los tejidos

15

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

20

25

Determinación del colágeno total y del CTX-II del suero

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

30

Cuantificación del ARNm del colágeno tipo III

El número de transcriptos del colágeno tipo III (Col3a1) en muestras de tejido del hígado se determinó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) mediante el uso de sondas reporteras fluorescentes. El número de copias Col3a1 en la muestra se extrapola a partir de una curva patrón que se obtuvo mediante el uso del ADNc plasmídico de Col3a1 Image Clone 7097081 (Geneservice, Cambridge, Reino Unido) como estándar de dilución. Las cantidades de Col3a1 se normalizaron con los genes domésticos hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1). Los iniciadores y sondas para los ARNm de Col3a1 y HPRT1 se diseñaron mediante el uso de las Secuencias de Referencia del NCBI NM_032085.1 y NM_012583.2 como moldes, respectivamente (TIB Molbiol GmbH, Berlín, Alemania). El ARN total se extrajo de muestras congeladas de hígado mediante el uso del estuche Absolutely RNA Miniprep (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) mediante el seguimiento de las instrucciones del fabricante y su calidad se evaluó en Nano chips de ARN mediante el uso de un instrumento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Inmediatamente después del aislamiento del ARN, el ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el estuche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Basilea, Suiza) mediante el uso de 1µg de ARN como molde. Para cada muestra que se ensayó, se incluyó un control negativo de síntesis de ADNc, omitiendo la enzima transcriptasa inversa de la mezcla de reacción. Las reacciones de PCR separadas para Col3a1 y HPRT1 se realizaron en un formato de 20µL mediante el uso del estuche LightCycler Faststart DNA Master Plus HybProbe (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los datos de fluorescencia en tiempo real se recogieron en un instrumento LightCycler 2.0 (Roche).

35

40

45

50

Extracciones

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

55

60

Densitometría

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

65

Análisis de imágenes de histología

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

SDS PAGE y Western blots

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

Análisis Estadístico

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

Resultados

Apariencia del hígado: En el momento del sacrificio, los hígados de los animales de control mostraron una morfología macroscópica normal, mientras que los hígados de los animales BDL eran agrandados. Los pesos de los hígados aumentaron significativamente en ratas BDL en comparación con los controles simulados (pesos medios al sacrificio: 2 semanas después de la cirugía, simulado 8.1 g; BDL 14.1 g; 4 semanas después de la cirugía, simulado 9.0 g; BDL 19.4 g) (Figura 4 panel A). La puntuación semicuantitativa de las secciones del hígado mediante el uso de la escala de 0-3 mostró significativamente más cambios estructurales del hígado a las 4 semanas en comparación con a las 2 semanas (Figura 4 Panel B). La Figura 4, panel A muestra el peso del hígado en las ratas con ligadura del conducto biliar (BDL) - o en las ratas con operación simulada. Los datos se muestran como la media + SEM. [***, $P < 0.0001$. El panel B muestra la puntuación de los cambios estructurales en el hígado de cada grupo. Los datos se muestran como media + SEM. **, $P = 0.0094$. El panel C muestra las microfotografías con Rojo Sirio que muestran la estructura hepática en ratas con operación simulada, y en ratas BDL a las 2 y 4 semanas después de la cirugía. La estructura hepática en todo el tracto portal se desorganiza claramente en las ratas BDL en comparación con las ratas con operación simulada. Los colágenos se resaltan en rojo. El aumento original fue x40.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 Se encontraron correlaciones de los siguientes: ARNm de Col3a1 con respecto al CO3-610C con $R^2=0.6993$ y $P<0.0001$ (Figura 9A), y del CO3-610C con respecto al % de colágeno que se cuantificó mediante el visiofarm con $R^2=0.2278$ y $P=0.0050$ (Figura 9B), y del ARNm de Col3a1 con respecto al % de colágeno que se cuantificó mediante el Visiopharm con $R^2=0.5409$ y $P<0.0001$ (Figura 9C).

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

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

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

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

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

fibrosis hepática, una de ellas es el marcador de formación del colágeno tipo III N-terminal pro-colágeno III. Este marcador representa la formación de colágeno tipo III y demostró que se aumenta en la fibrosis hepática en estudios anteriores.

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

Ejemplo 6: ELISA en muestras de suero humanas

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

Ejemplo 7: Reactividad del clon nb94

25 Los ratones se inmunizaron con el péptido sintético KAFVFP (sec. con núm. de ident.:1167) conjugado con ovoalbúmina (KAFVFPKESD-GGC-OVA (sec. con núm. de ident.:1049)), se usaron células de bazo para la fusión, y los anticuerpos monoclonales se comprobaron para determinar la reactividad con el KAFVFP biotinilado (sec. con núm. de ident.: 1167) , es decir, (KAFVFPKESD-biotina (sec. con núm. de ident.:1049)) inmovilizado en pocillos de placas de microtitulación recubiertas previamente con estreptavidina. Los anticuerpos que se unen al KAFVFPKESD biotinilado (sec. con núm. de ident.:1049), que podrían ser inhibidos mediante la co-incubación con el KAFVFPKESD (sec. con núm. de ident.:1049) pero no con el péptido alargado RKAFVFPKESD (SEQ ID N01166), se seleccionaron para una caracterización adicional. El anticuerpo monoclonal preferido se designó NB94-37-1A7.

35 El uso de un ELISA de competencia, se realizó esencialmente como se describió anteriormente con el KAFVFPKESD biotinilado (sec. con núm. de ident.:1049) (utilizado a 0.15 ng/ml) inmovilizado en los pocillos de las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina, una etapa de incubación (90 minutos a 20°C) con la muestra y el anticuerpo monoclonal NB94-37-1A7 seguido por una etapa de lavado, y después la adición de inmunoglobulinas anti-ratón conjugados con peroxidasa. Para la competencia se usó el siguiente material en diluciones dobles; (1) el péptido sintético KAFVFP (SEQ ID N01167); (2) un péptido sin sentido (KNEG TG) no relacionado con la CRP; (3) una mezcla de muestras de suero humano; (4) la CRP escindida proteolíticamente con MMP3 durante 7 días, posteriormente detenida mediante la adición de EDTA para bloquear la actividad de la proteasa, y almacenada a -80 °C hasta las pruebas; (5) igual que (4), pero con el uso de MP8 en lugar de MMP3; (6) igual que (4) excepto por el uso de cathepsina K (durante 2 días) en lugar de MP3 (y E64 como inhibidor para bloquear la actividad de la cathepsina K).

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

50 Ejemplo 8: CO3 en muestras biológicas relevantes: Niveles de CO3 en cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl4) en ratas.

Animales e inducción de la cirrosis:

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

Cuantificación de la fibrosis:

65 Las secciones de hígado (4 µM) se tiñeron en 0.1 % de rojo Sirio F3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en ácido pícrico saturado (Sigma-Aldrich). El área de fibrosis relativa (que se expresó como un porcentaje del área total del hígado) se evaluó mediante el análisis de 36 campos de las secciones de hígado que se tiñeron con rojo Sirio por animal. Cada

5 campo se adquirió con un aumento de 10X [microscopio E600 (Nikon) y cámara digital RT-Slider SPOT (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). Los resultados se analizaron mediante el uso de un sistema de morfometría Bioquant Life Science computarizado. Para evaluar el área de fibrosis relativa, el área de colágeno que se midió se dividió por el área de campo neta y luego se multiplicó por 100. La resta del área luminal vascular de la superficie total del campo produjo el cálculo final de la superficie neta de la fibrosis. De cada animal que se analizó, se midió la cantidad de fibrosis en porcentaje y el valor promedio que presentó.

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

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

15 Medición de ácido hialurónico:

El hialuronano en suero se midió mediante el uso de un estuche de ELISA sándwich (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

20 Estadísticas:

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

25 Diseño del Estudio:

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

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

55 Resultados:

Validación histológica del modelo:

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

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

El marcador CO3 del suero muestra un aumento estadísticamente significativo en las ratas fibróticas y cirróticas en

comparación con las ratas de control. Los animales se clasificaron de acuerdo a una tinción totalmente automatizada con rojo sirio el procedimiento de hígado que se utilizó para cuantificar la fibrosis (Figuras 13 y 14).

La Figura 13 muestra los niveles del CO3 en las ratas de control y en las que inhalaban CCl_4 como se realizó en el Hospital Clínic (Barcelona). Cada punto representa un animal. Las ratas se clasificaron según un método de análisis de imagen computarizado de la tinción con rojo sirio del hígado que se utilizó para cuantificar la fibrosis.

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

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

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

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

Ejemplo 9: Fibrosis de la piel inducida por bleomicina en ratones.

Los ratones se trataron mediante la aplicación en la piel de PBS o bleomicina. El aumento de los niveles en la orina del fragmento CO3-610 de la degradación del colágeno III (CO3) por la MMP-9 se asocia con la progresión de la fibrosis en la piel en los ratones.

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

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

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

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

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

En esta descripción, a menos que expresamente se indique lo contrario, la palabra "o" se usa en el sentido de un operador que regresa un valor verdadero cuando una o ambas de las condiciones indicadas se cumple, en contraposición con el operador "exclusivo o" que requiere que sólo una de las condiciones se cumpla. La palabra "comprende" se usa en el sentido de "que incluye" y no en el sentido de "que consiste en". El no reconocimiento de cualquier documento que se publicó antes en la presente invención debe tomarse como una admisión o una representación de que la enseñanza de la misma era de conocimiento general común en Australia o en cualquier otro lugar en la fecha de la misma.

Lista de referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Reducing Risks, Promoting Healthy Life, Ginebra: WHO, 2002:1-230.
- 5 2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105.
4. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.
- 10 5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-529.
6. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S47-S56.
7. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425.
- 15 8. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-C9.
9. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):307-313.
- 20 10. Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc Res Tech* 1997;38:407-412.
11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-1546.
- 25 12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. *Lung Biology in Health and Disease*. 80 ed. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 1995.
13. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:77-84.
14. Gilliam AC. Scleroderma. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:258-279.
- 30 15. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76-99.
16. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-2051.
17. Svensson L, Oldberg A, Heinegard D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:S23-S28.
- 35 18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12:19-32.
19. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem* 1987;262:13120-13125.
20. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 1999;72:210-220.
- 40 21. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 1992;267:19536-19547.
22. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 1994;269:10119-10126.
- 45 23. Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 1992;267:20613-20619.
24. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264:4571-4576.
- 50 25. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* 1995;270:7437-7444.
26. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24:153-166.
- 55 27. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444.
28. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 1999;147:909-912.
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
- 60 30. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384.
31. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007;27:413-426.
32. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184.

33. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 2006;107:1397-1404.
34. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein AL, Pure E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 2006;37:352-360.
- 5 35. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:93-101.
36. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006;73:490-494.
37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137.
- 10 38. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S32-S38.
39. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998;15:22-37.
- 15 40. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007;381:107-113.
41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic predisposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 2007;11:1031-1051.
42. Mariat C. [Diagnosis and follow-up of chronic kidney graft dysfunction: from DFG to new biomarkers]. *Nephrol Ther* 2008;4 Suppl 3:S204-S207.
- 20 43. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007;42:573-582.
- 25 44. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998;5:187-192.
45. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2006;26:1095-1099.
- 30 46. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:945-951.
47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.
- 35 48. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (igf-I) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:3245-3250.
49. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2007;7:17.
- 40 50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.
- 45 51. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:775-782.
52. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, Zarski JP. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006;13:643-651.
- 50 53. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1073-1076.
54. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:843-848.
- 55 55. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006;12:3338-3343.
56. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1128-1136.
- 60 57. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-942.
58. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:1031-1039.
- 65

59. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-992.
60. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosenthal-Allieri MA, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13:659-670.
61. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovic study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008;48:765-773.
62. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
63. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:31-37.
64. Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395-402.
65. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattonet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:547-555.
66. Leroy V, Halfon P, Bacq Y, Boursier J, Rousselet MC, Bourliere M, De MA, Sturm N, Hunault G, Penaranda G, Brechot MC, Trocme C, Cales P. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data. *Clin Biochem* 2008;41:1368-1376.
67. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Le BB, de L, V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:6.
68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002;9:128-133.
69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
70. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrec D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de L, V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007;7:40.
71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-1896.
72. Naveau S, Raynard B, Ratziu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:167-174.
73. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Grimaldi A, Poynard T. Screening for liver fibrosis by using a noninvasive biomarker in patients with diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:828-831.
75. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
76. Poynard T, Zoulim F, Ratziu V, Degos F, Imbert-Bismut F, Deny P, Landais P, El HA, Slama A, Blin P, Thibault V, Parvaz P, Munteanu M, Trepo C. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1970-1980.
77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.
78. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.
79. Carvalho-Filho RJ, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Sampaio JP, Lanzoni VP, Ferraz ML, Silva AE. Optimized cutoffs improve performance of the aspartate aminotransferase to platelet ratio index for

- predicting significant liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection. *Liver Int* 2008;28:486-493.
80. Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *HIV Med* 2005;6:375-378.
- 5 81. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2008.
82. Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Viganò M, Del PP, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. *J Hepatol* 2008;49:564-571.
- 10 83. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008;397:51-54.
84. Snyder N, Gajula L, Xiao SY, Grady J, Luxon B, Lau DT, Soloway R, Petersen J. APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:535-542.
85. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2007;381:119-123.
- 15 86. Hongbo L, Xiaohui L, Hong K, Wei W, Yong Z. Assessing routine and serum markers of liver fibrosis in CHB patients using parallel and serial interpretation. *Clin Biochem* 2007;40:562-566.
87. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
- 20 88. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005;51:1867-1873.
89. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297-306.
- 25 90. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:582-588.
91. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H, Forouzanfar MH, Abedian S, Tavangar SM, Mohamadkhani A, Ghoujehi F, Estakhri A, Nouri N, Farzadi Z, Najjari A, Malekzadeh R. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-virus related liver disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2537-2545.
- 30 92. Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007;120:280-14.
93. Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:242-247.
- 35 94. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686-693.
- 40 95. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
96. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.
- 45 97. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.
98. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:731-738.
- 50 99. Moller S, Hansen M, Hillingso J, Jensen JE, Henriksen JH. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. *Gut* 1999;44:417-423.
100. Rosen HN, Parker RA, Greenspan SL, Iloputaife ID, Bookman L, Chapin D, Perlmutter I, Kessel B, Qvist P, Rosenblatt M. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. *Calcif Tissue Int* 2004;74:415-423.
- 55 101. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA, Jung K. Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. *Eur Urol* 2007.
- 60 102. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, bdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Immunoassay Immunochem* 2007;28:199-211.
103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1423-1431.

104. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemela O. Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. *Liver Int* 2008;28:787-797.
- 5 105. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994;20:388-393.
106. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, .Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995;75:913-918.
- 10 107. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
108. Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., and Nagase, H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29:10261-10270.
- 15 109. Lijnen, H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost* 86:324-333.

Reivindicaciones

1. Un método de inmunoensayo para medir fragmentos de proteína que contienen neo-epítopos naturalmente presentes en la muestra de fluido corporal, en donde dicho inmunoensayo se lleva a cabo mediante un método que comprende: contactar fragmentos de proteína naturalmente presentes en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica reactiva con un neo-epítipo N-terminal formado por escisión de una proteína por una proteinasa o un neo-epítipo C-terminal formado por escisión de una proteína por una proteinasa, cuya pareja de unión inmunológica es no reactiva con la proteína intacta a partir de la cual se deriva el epítipo y es no reactiva con una versión prolongada de la secuencia del neo-epítipo en la que la secuencia del neo-epítipo se prolonga más allá del sitio de escisión, y medir la extensión de la unión de los fragmentos de péptidos a dicha pareja de unión inmunológica para medir fragmentos de proteína que comprende dicho neo-epítipo, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constituido por una secuencia de aminoácido N-terminal presente en los péptidos producidos por escisión de colágeno tipo I, dichos péptidos comprenden una secuencia N-terminal seleccionada del grupo que consiste en:

Colágeno I, alfa 1		
ISVPGP...sec. con núm. de ident.:23	VPGPMG...sec. con núm. de ident.:24	PGPMGP...sec. con núm. de ident.:25
FQGPPG...sec. con núm. de ident.:27	KNGDDG...sec. con núm. de ident.:28	ARGLPG...sec. con núm. de ident.:29
LDGAKG...sec. con núm. de ident.:31	LPGERG...sec. con núm. de ident.:32	ATGAAG...sec. con núm. de ident.:67
VRGEPG...sec. con núm. de ident.:33	PGAKGA...sec. con núm. de ident.:34	GIAGAP...sec. con núm. de ident.:69
GGPPGP...sec. con núm. de ident.:35	NSGEPG...sec. con núm. de ident.:36	VQGPPG...sec. con núm. de ident.:71
DGVAGP...sec. con núm. de ident.:37	ERGSFG...sec. con núm. de ident.:38	RGSPGP...sec. con núm. de ident.:74
LTGSPG...sec. con núm. de ident.:39	QDGRPG...sec. con núm. de ident.:40	ARGQAG...sec. con núm. de ident.:77
RGVPGP...sec. con núm. de ident.:41	VGPAGK...sec. con núm. de ident.:42	KDGEAG...sec. con núm. de ident.:80
ERGEQG...sec. con núm. de ident.:43	RGEQGP...sec. con núm. de ident.:44	QGLPGP...sec. con núm. de ident.:83
PGERGV...sec. con núm. de ident.:45	ANGAPG...sec. con núm. de ident.:46	AGLPGP...sec. con núm. de ident.:86
ARGAPG...Sec. con núm de ident.:47	PGDRGE...Sec. con núm de ident.:48	FAGPPG...Sec. con núm de ident.:75
AKGDAG...Sec. con núm de ident.:49	PIGNVG...Sec. con núm de ident.:50	NVGAPG...Sec. con núm de ident.:78
AAGRVG...Sec. con núm de ident.:51	PPGPAG...Sec. con núm de ident.:52	GEVGPP...Sec. con núm de ident.:81
GADGPA...Sec. con núm de ident.:53	GPQGIA...Sec. con núm de ident.:54	IAGQRG...Sec. con núm de ident.:84
GQRGVV...Sec. con núm de ident.:55	QRGVVG...Sec. con núm de ident.:56	RGVVGL...Sec. con núm de ident.:87
GLPGQR...Sec. con núm de ident.:57	PGLPGP...Sec. con núm de ident.:58	EPGKQG...Sec. con núm de ident.:90
PMGPPG...Sec. con núm de ident.:59	MGPPGL...Sec. con núm de ident.:60	LAGPPG...Sec. con núm de ident.:89
DKGETG...Sec. con núm de ident.:61	LQGPPG...Sec. con núm de ident.:62	PSGASG...Sec. con núm de ident.:92

ES 2 635 494 T3

5	SAGAPG...Sec. con núm de ident.:63	RTGDAG...Sec. con núm de ident.:64	VGPPGP...Sec. con núm de ident.:99
	FDFSF...Sec. con núm de ident.:65	DFSF...Sec. con núm de ident.:66	AGQRGV...Sec. con núm de ident.:95
10	LPGPGG...Sec. con núm de ident.:26	QAGVMG...Sec. con núm de ident.:76	VVGLPG...Sec. con núm de ident.:98
	SGLDGA...Sec. con núm de ident.:30	PAGERG...Sec. con núm de ident.:79	GKQGPS...Sec. con núm de ident.:93
15	AKGEAG...Sec. con núm de ident.:68	ARGERG...Sec. con núm de ident.:82	ARGPAG...Sec. con núm de ident.:96
	IAGAPG...Sec. con núm de ident.:70	LTGPIG...Sec. con núm de ident.:85	ASGPAG...Sec. con núm de ident.:97
20	LPGPPG...Sec. con núm de ident.:72	AGPPGA...Sec. con núm de ident.:88	GPPGPP...Sec. con núm de ident.:100
	AGPKGS...Sec. con núm de ident.:73	ATGFPG...Sec. con núm de ident.:91	
25		GPPGPA...Sec. con núm de ident.:94	

o en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constituido por una secuencia de aminoácidos C-terminal presente en los péptidos que se producen por escisión del colágeno tipo III, dichos péptidos comprenden una secuencia C-terminal que se selecciona del grupo que consiste en:

Colágeno I, alfa 1			
35	...QLSYGY sec. con núm. de ident.:101	...EKSTGG sec. con núm. de ident.:102	...PPGPQG sec. con núm. de ident.:103
	...KGRHGF sec. con núm. de ident.:104	...PSGPRG sec. con núm. de ident.:105	...APGPQG sec. con núm. de ident.:106
40	...APGPAG sec. con núm. de ident.:107	...FPGAVG sec. con núm. de ident.:108	...SEGPQG sec. con núm. de ident.:109
	...GANGAP sec. con núm. de ident.:110	...ANGAPG sec. con núm. de ident.:46	...SGPQGP sec. con núm. de ident.:112
45	...EPGPVG sec. con núm. de ident.:113	...EPGPTG sec. con núm. de ident.:114	...RGFPGA sec. con núm. de ident.:115
	...KGPAGE sec. con núm. de ident.:116	...RGSPPG sec. con núm. de ident.:74	...LPGAKG sec. con núm. de ident.:118
50	...AVGPAG sec. con núm. de ident.:122	...PPGARG sec. con núm. de ident.:120	...PGKAGE sec. con núm. de ident.:121
	...APGPDG sec. con núm. de ident.:125	...PAGPAG sec. con núm. de ident.:123	...AGPAGE sec. con núm. de ident.:124
55	...KDGVRG sec. con núm. de ident.:128	...RGERGF sec. con núm. de ident.:126	...PAGPRG sec. con núm. de ident.:127
	...PGPAGF sec. con núm. de ident.:131	...PAGPTG sec. con núm. de ident.:129	...TGARGA sec. con núm. de ident.:130
60	...SAGPPG sec. con núm. de ident.:134	...EPGDAG sec. con núm. de ident.:132	...PAGPPG sec. con núm. de ident.:133
	...GEVGPP sec. con núm. de ident.:81	...ATGFPG sec. con núm. de ident.:91	...NAGPPG sec. con núm. de ident.:136

65

5	...PGPQGI sec. con núm. de ident.:140	...GEKGSP SEQ ID 138	...GAPGTP sec. con núm. de ident.:139
	...IAGQRG sec. con núm. de ident.:84	...GPQGIA sec. con núm. de ident.:54	...PQGIAG sec. con núm. de ident.:142
10	...GPSGEP sec. con núm. de ident.:146	...GQRGVV sec. con núm. de ident.:55	...RGERGF sec. con núm. de ident.:126
	...PVGPPG sec. con núm. de ident.:149	...ERGPFG sec. con núm. de ident.:147	...RGPPGP sec. con núm. de ident.:148
15	...EQGPSG sec. con núm. de ident.:152	...PQGPRG SEQ ID 150	...HRGFSG sec. con núm. de ident.:151
	...GPPGPP sec. con núm. de ident.:100	...PRGPFG sec. con núm. de ident.:153	...PPGPRG sec. con núm. de ident.:154
20	...PPGPPG sec. con núm. de ident.:119	...GPPSAG sec. con núm. de ident.:156	...PPSAGF sec. con núm. de ident.:157
	...QMGPFG sec. con núm. de ident.:161	...PPGPAG sec. con núm. de ident.:52	...TPGPQG sec. con núm. de ident.:160
25	...PGADGQ sec. con núm. de ident.:164	...PGPPGA SEQ ID 162	...QGIAGQ SEQ ID 163
	...PPGPKG sec. con núm. de ident.:167	...AGSPGF sec. con núm. de ident.:165	...LPGPSG sec. con núm. de ident.:166
30	...PKGPAG sec. con núm. de ident.:170	...PGERGA sec. con núm. de ident.:168	...PMGPPG sec. con núm. de ident.:59
	...GPAGRP sec. con núm. de ident.:173	...PPGPIG sec. con núm. de ident.:174	...SPGEQG sec. con núm. de ident.:172
35	...TGDAGP sec. con núm. de ident.:175		

2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicha pareja de unión inmunológica se une específicamente a un neo-epítipo constituido por una secuencia de aminoácidos C-terminal presente en los péptidos producidos por escisión del colágeno tipo I, dichos péptidos comprenden una secuencia C-terminal ...KDGVRG de sec. con núm. de ident.:128.
3. Un método *in vitro* como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, conducido como un método de diagnóstico o cuantificación de fibrosis y que comprende asociar una elevación de dicha medida de fragmentos de proteína que contienen neo-epítipos en dicha muestra de fluido corporal por encima de un nivel normal con la presencia o extensión de fibrosis.

Curva estándar

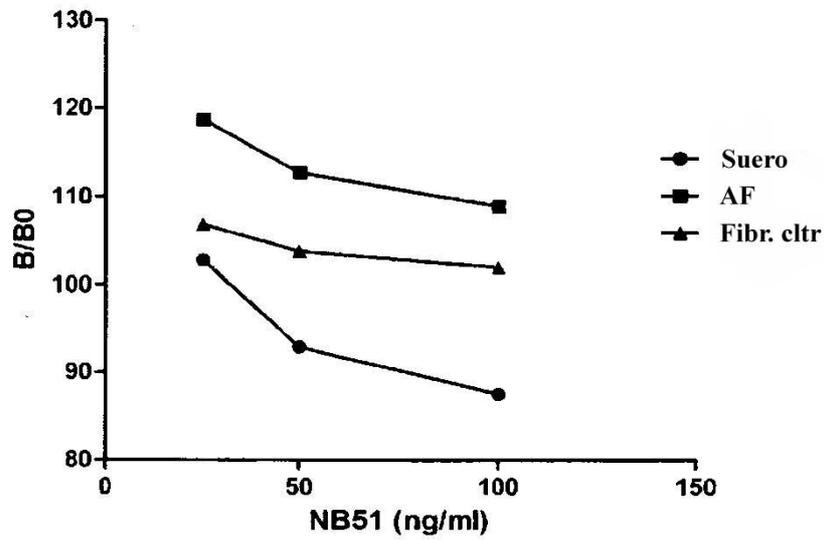


Figura 1

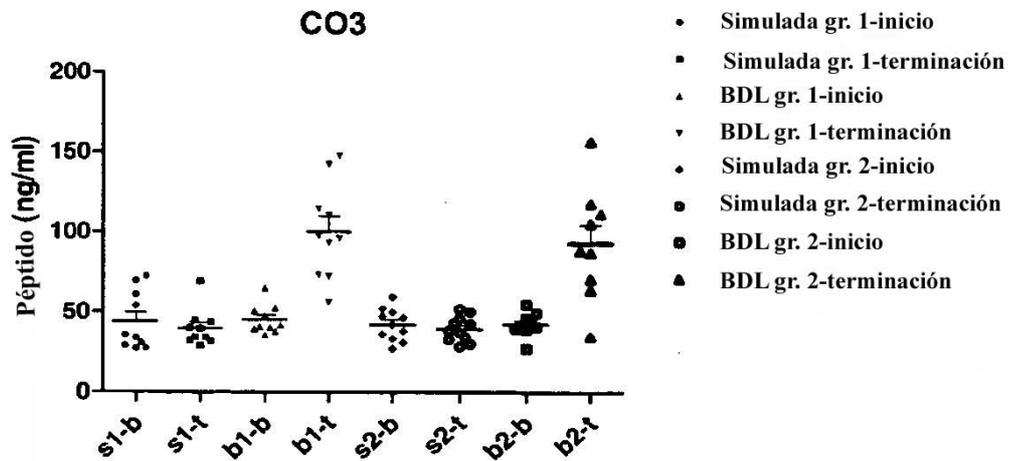


Figura 2A

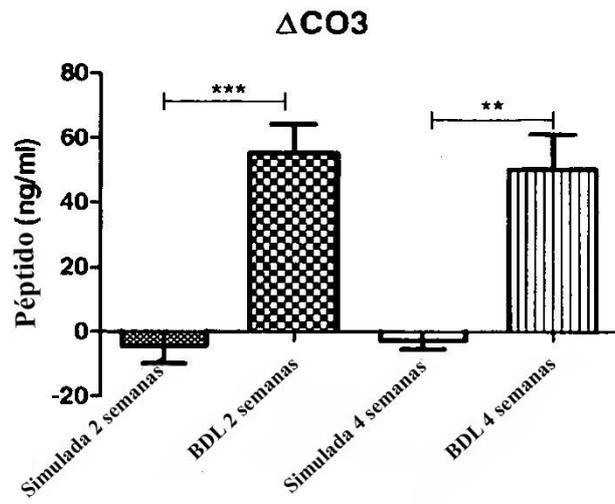


Figura 2B

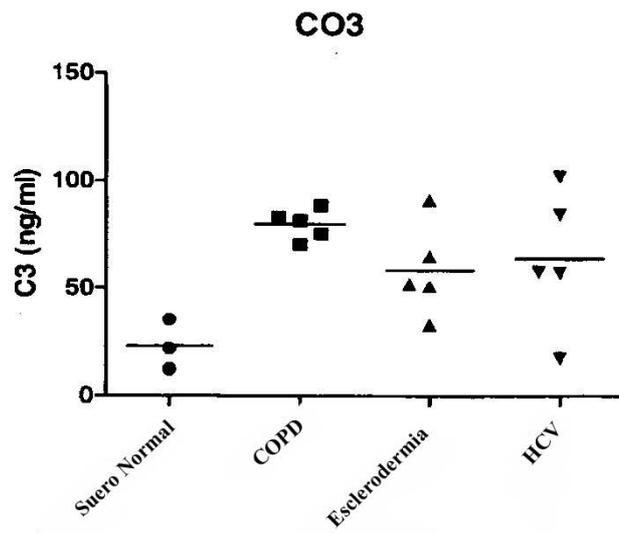


Figura 3

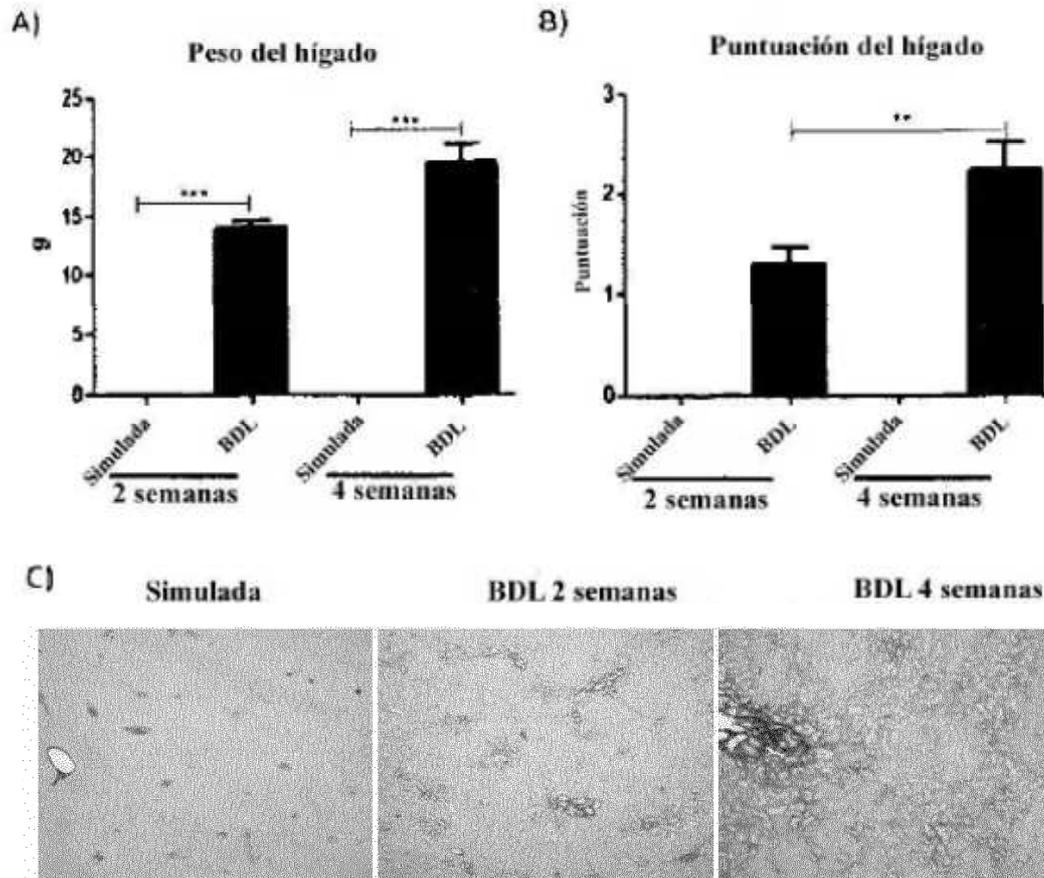


Figura 4

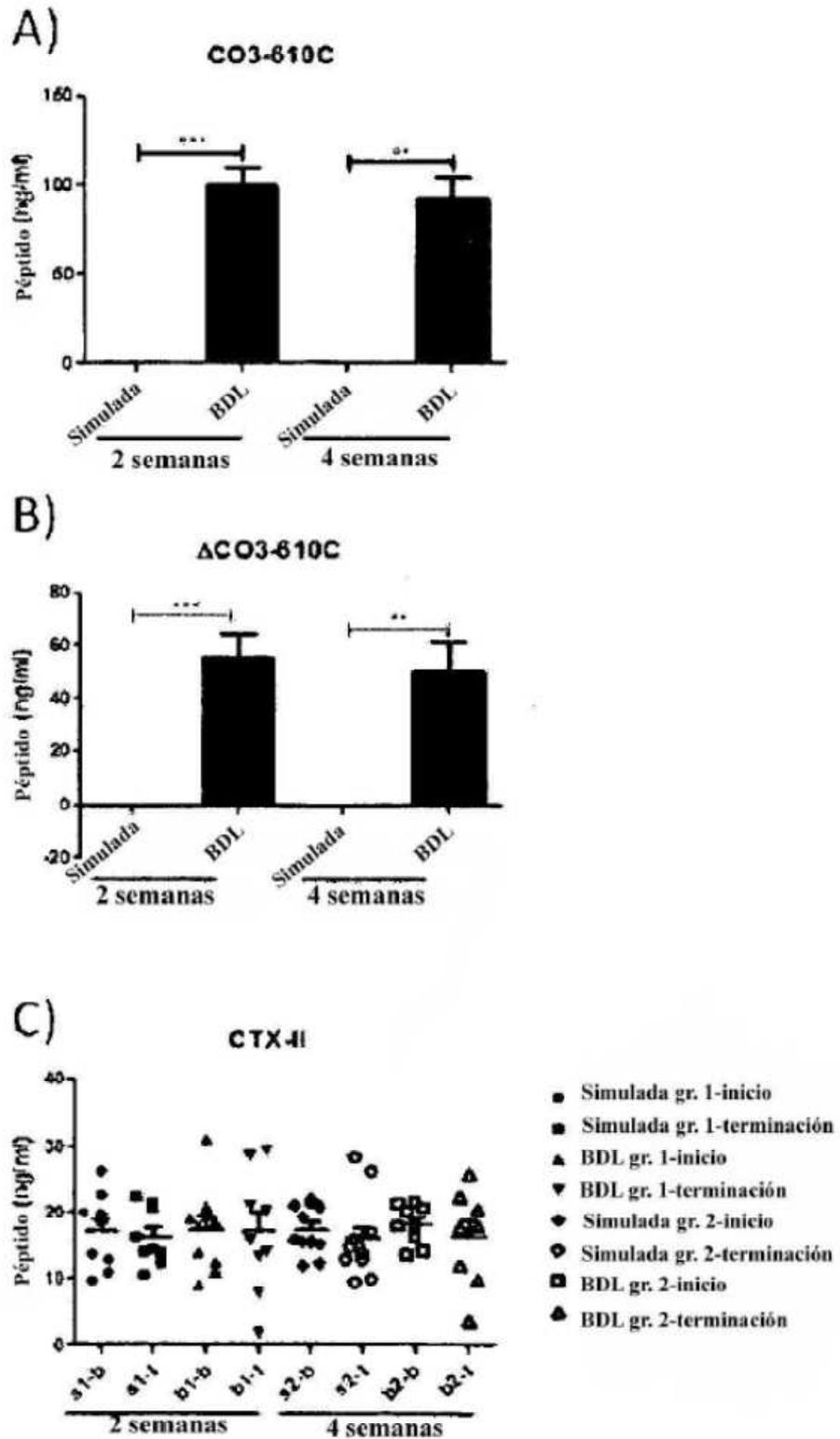


Figura 5

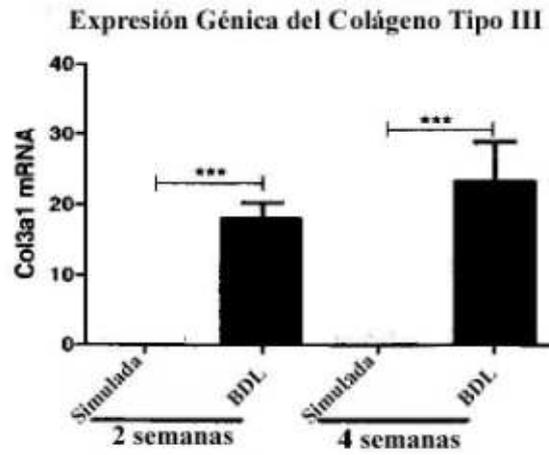


Figura 6

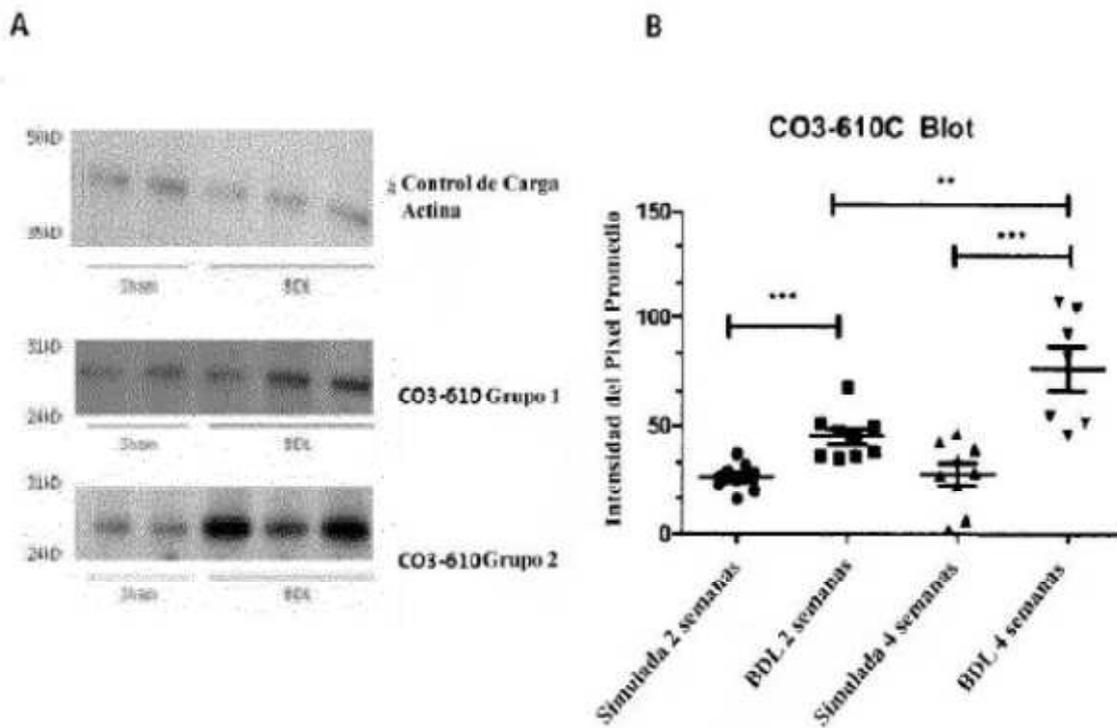
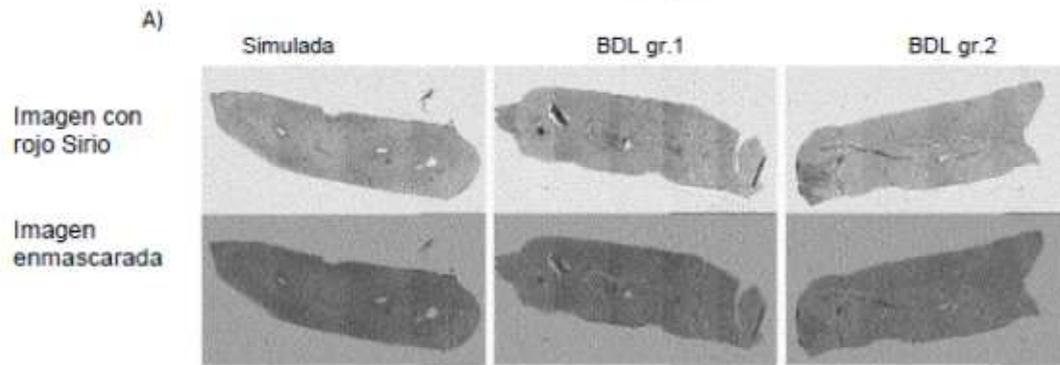


Figura 7



B) Colágeno total cuantificado mediante el Visinpharm

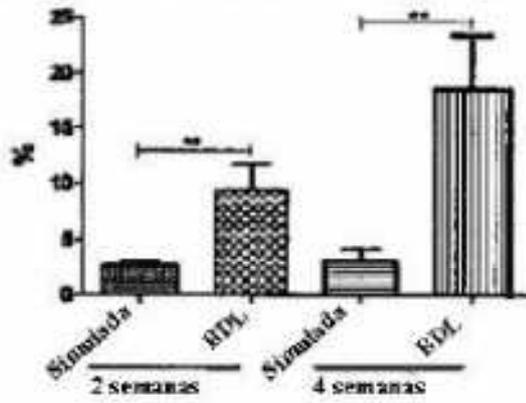
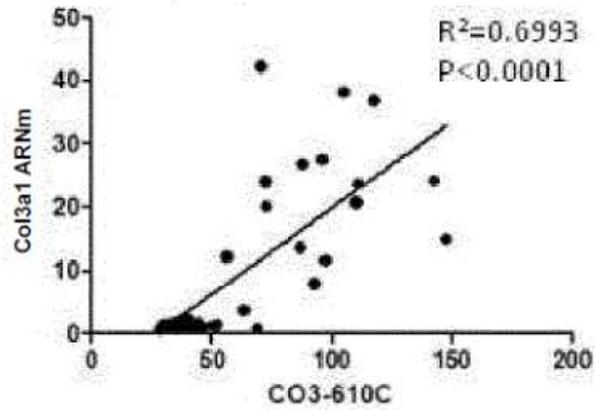


Figura 8

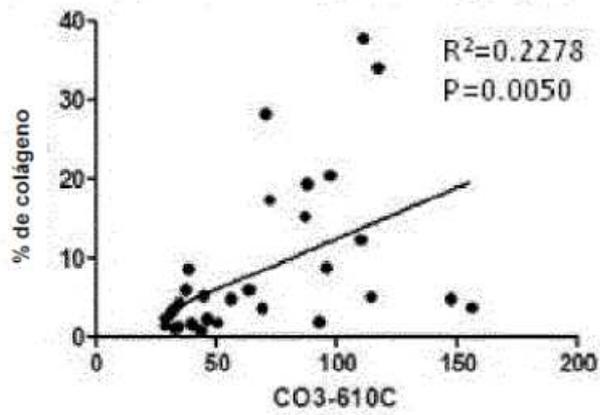
A)

Correlación de CO3-610C respecto a CO3



B)

Correlación de CO3-610C respecto a los datos del Visiopharm



C)

Correlación de CO3a1 respecto al % de Colágeno

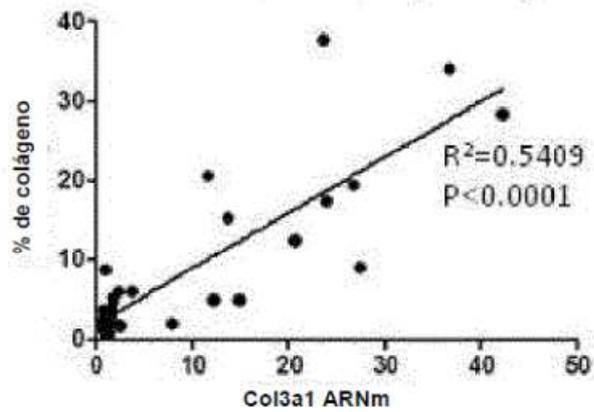


Figura 9

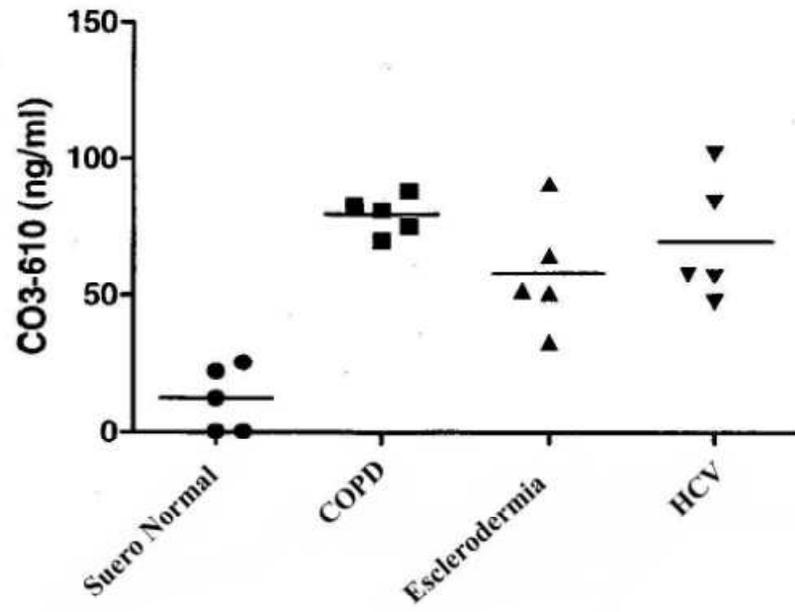


Figura 10

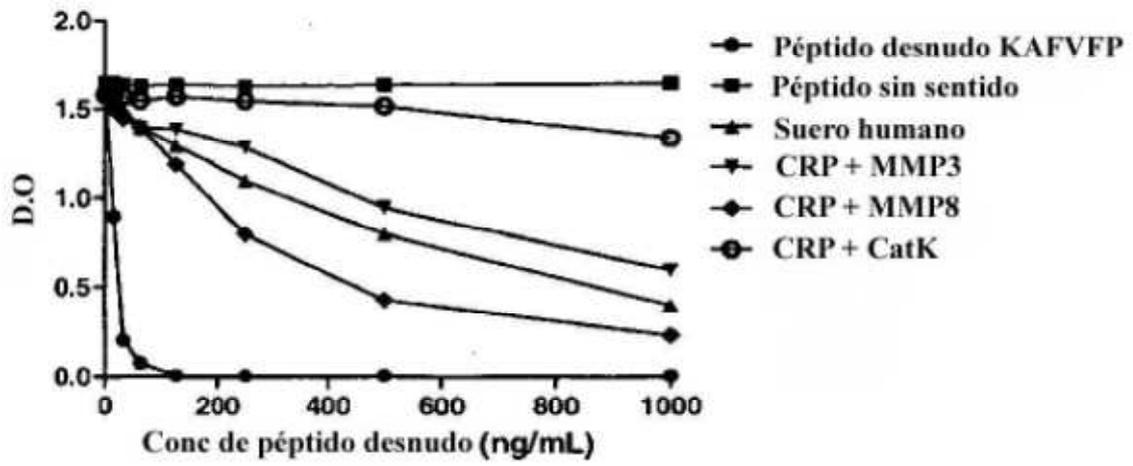


Figura 11

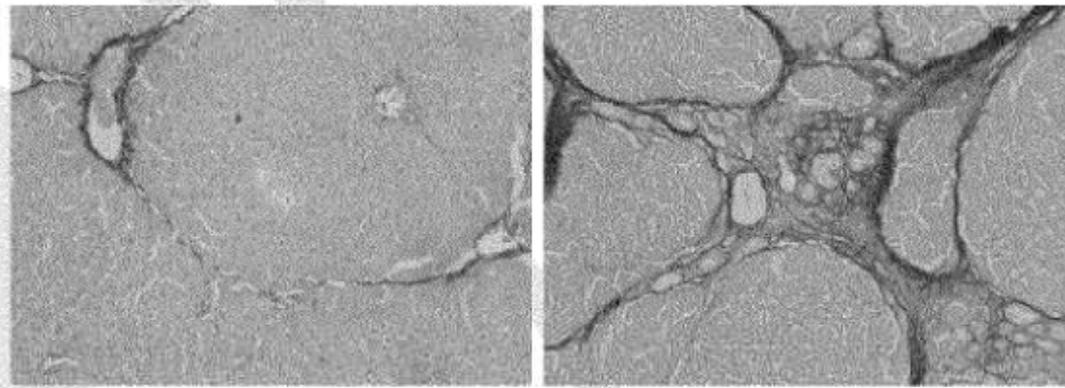
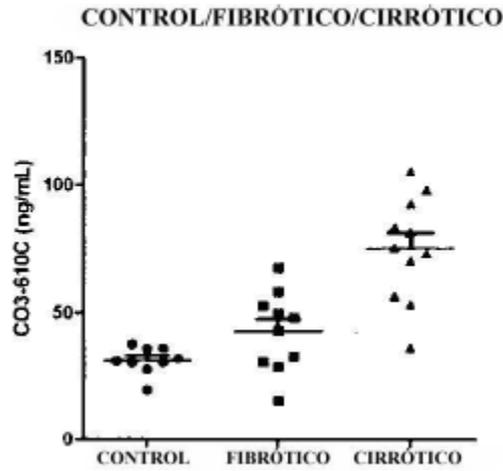


Figura 12

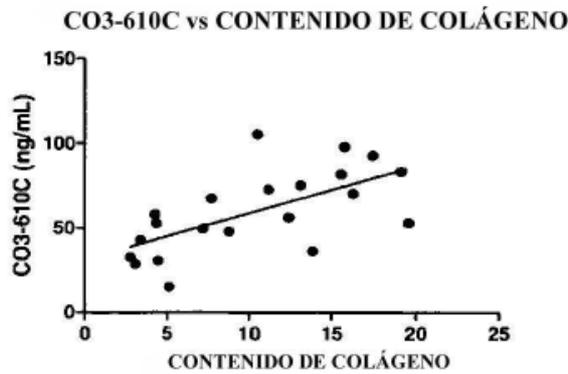


CONTROL VS CIRRÓTICO

FIBRÓTICO VS CIRRÓTICO

Prueba t no pareada Valor de P	P<0.e0001	Prueba t no pareada Valor de P	0.0007 ***
Resumen del valor de P	***	Resumen del valor de P	***
¿Son las medias signif. diferentes? (P<0.05)	SI	¿Son las medias signif. diferentes? (P<0.05)	SI

Figura 13



Número de pares XY	21
Pearson r	0.6393
Intervalo de confianza de 95%	0.2866 a 0.8394
Valor de P (dos colas)	0.0018
Resumen del valor de P	**
Es la correlación significativa? (alfa=0.05)	Sí
R cuadrado	0.4087

Figura 14

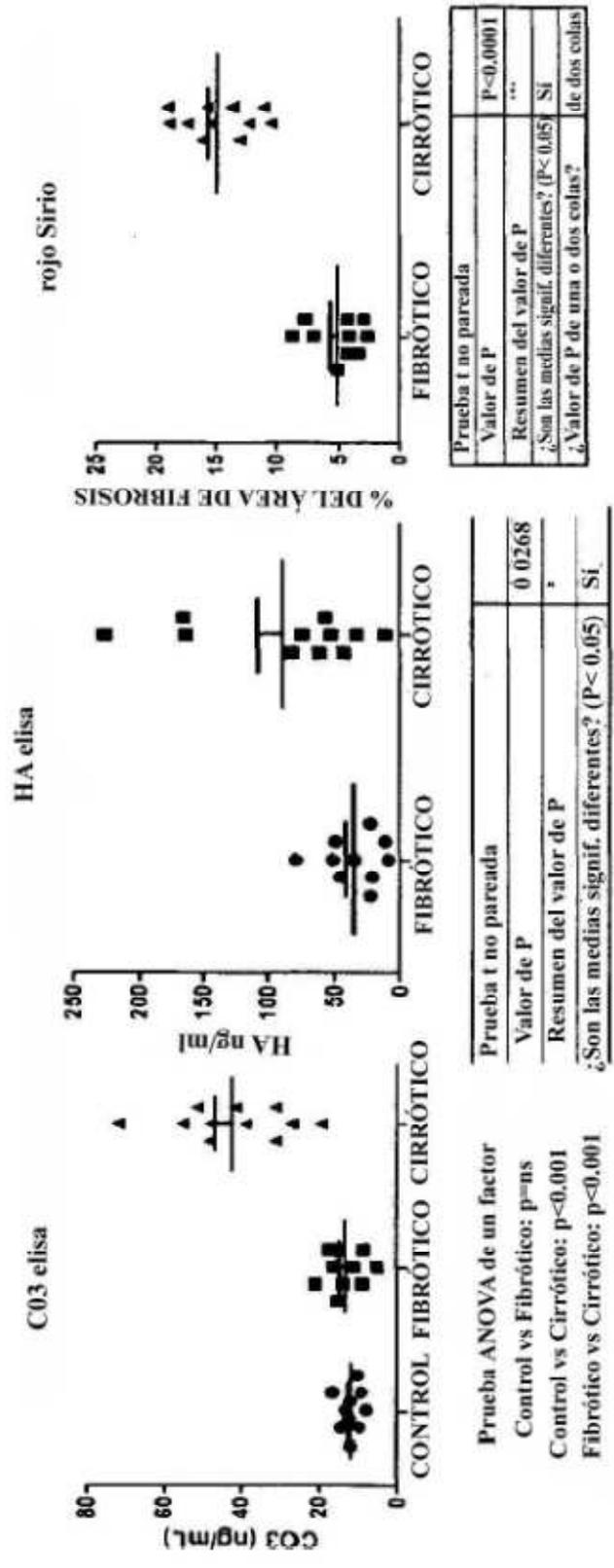


Figura 15

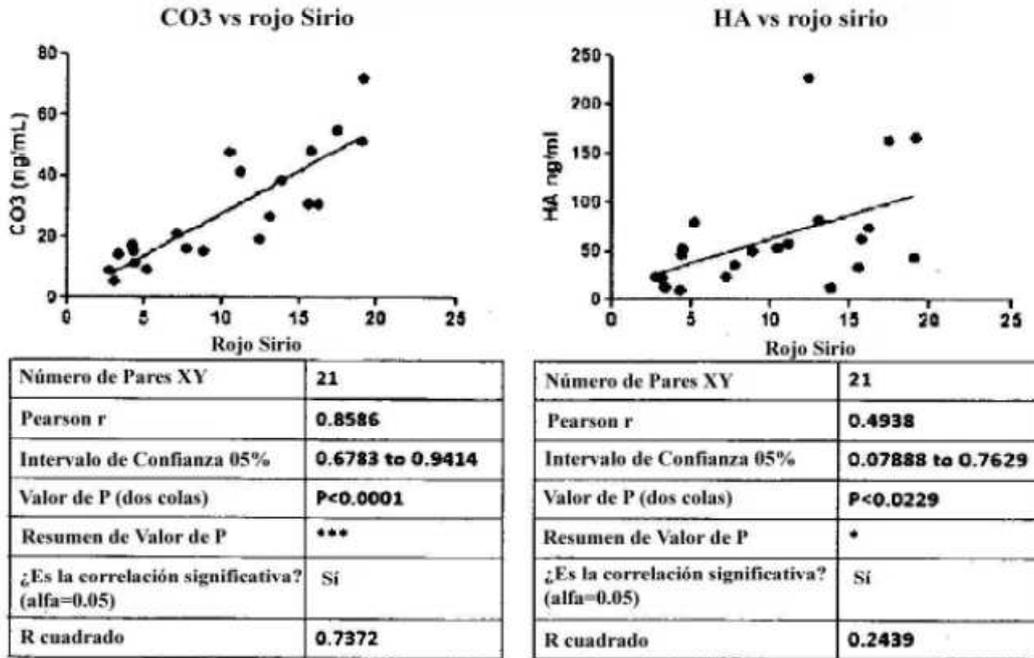


Figura 16

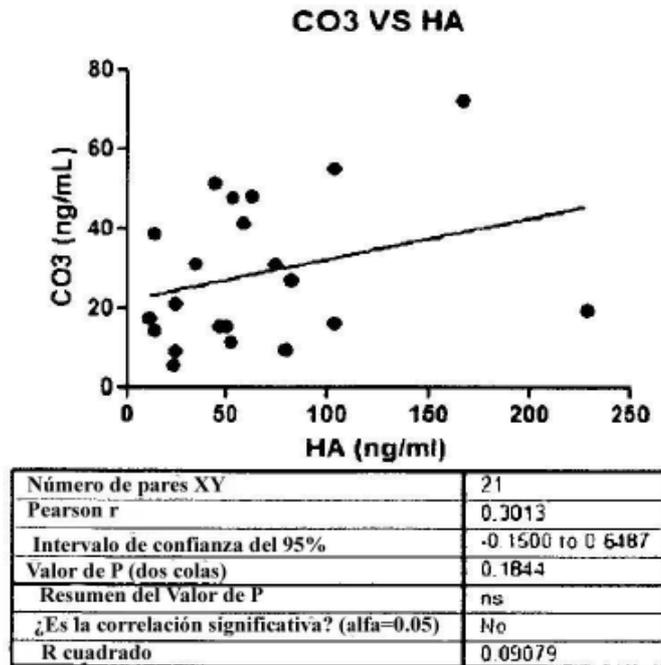


Figura 17

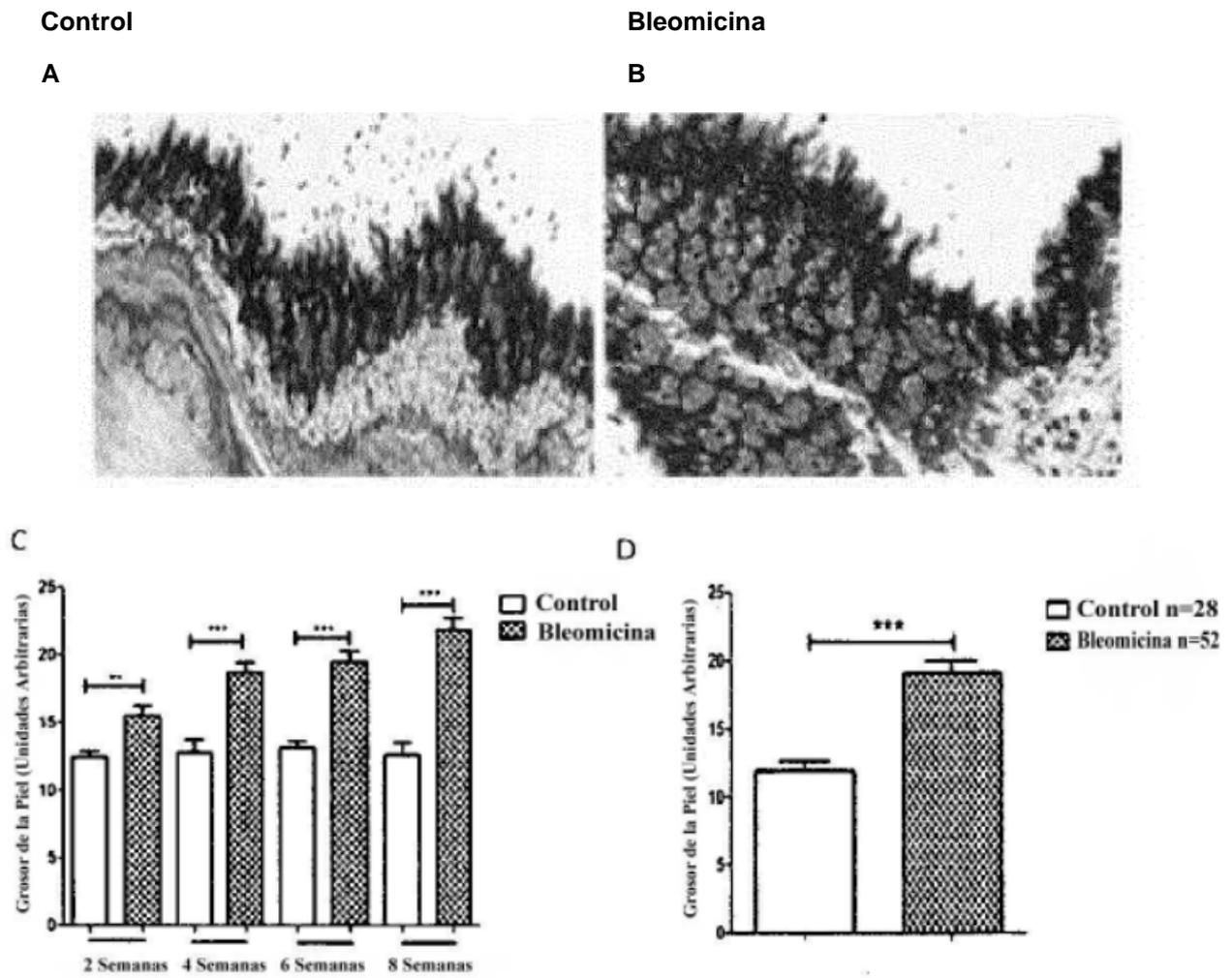


Figura 18

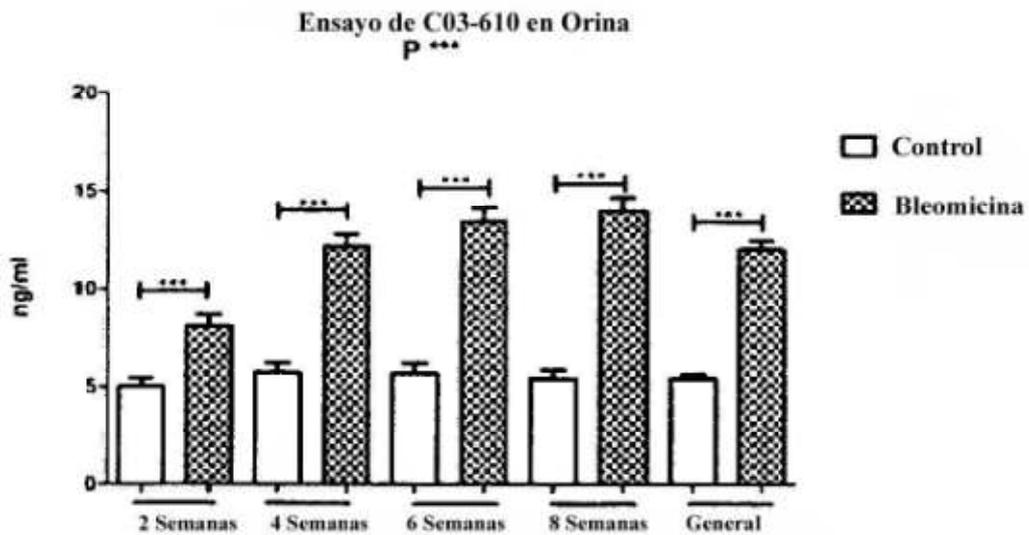


Figura 19

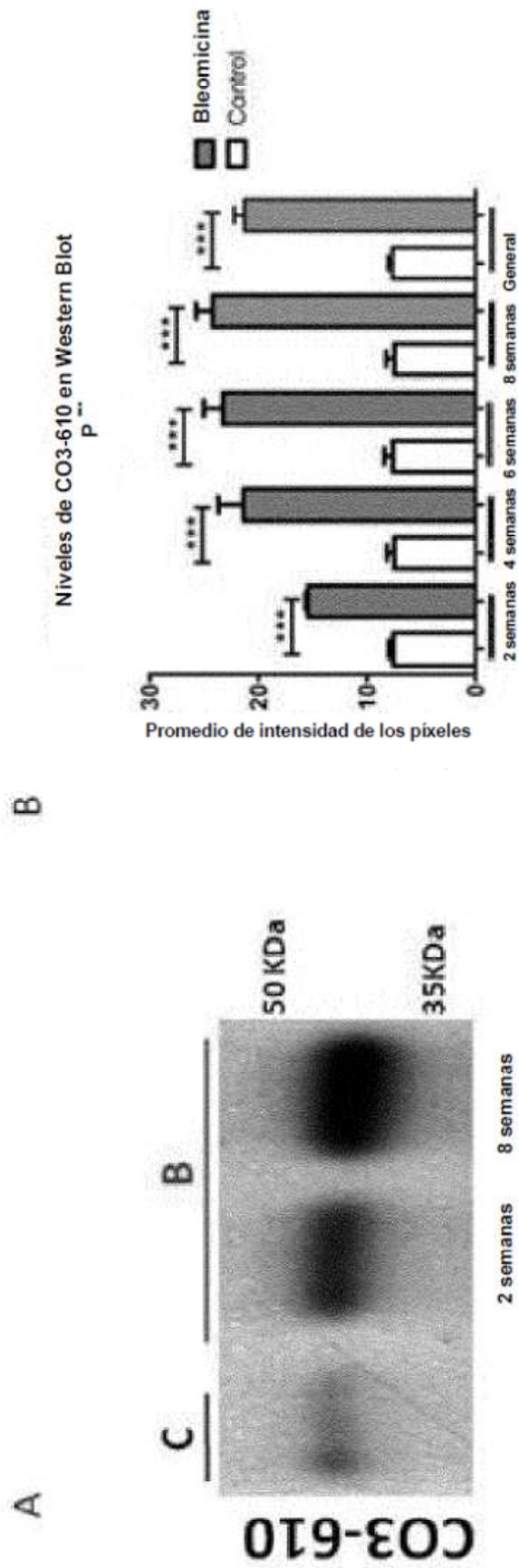


Figura 20

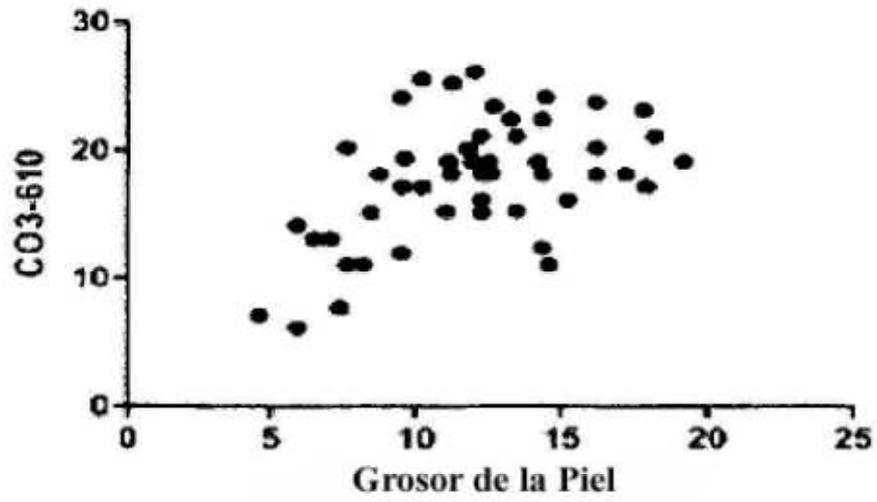


Figura 21

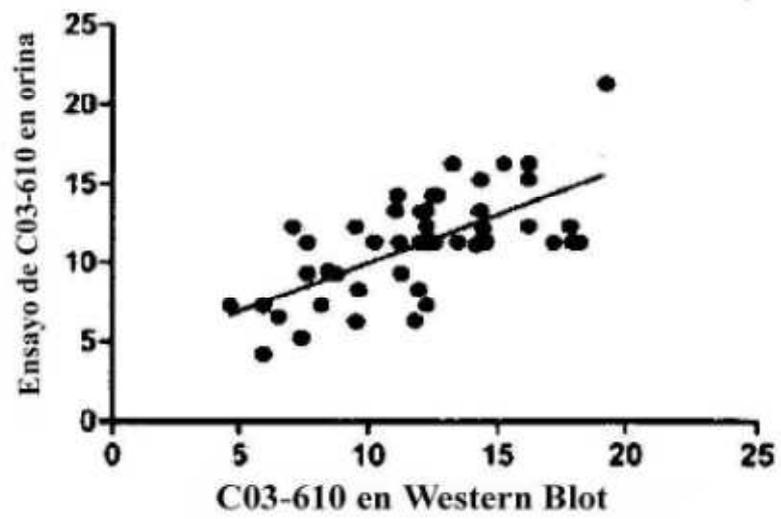


Figura 22