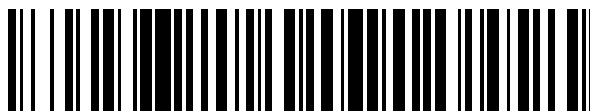


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 121**

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2014.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2010 PCT/EP2010/064178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11036267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10757603 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2480874**

54 Título: **Espectroscopía de infrarrojos en suero para la evaluación no invasiva de la fibrosis hepática en pacientes con enfermedad hepática crónica**

30 Prioridad:

24.09.2009 EP 09305895

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

21.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE
(U.R.C.A.) (100.0%)**

**Villa Douce 9 boulevard de la Paix
51097 Reims Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**THIEFIN, GÉRARD;
MANFAIT, MICHEL;
SOCKALINGUM, GANESH DHROUVANANDA;
SCAGLIA, ELODIE y
SCHMITT, JUERGEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 121 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

Espectroscopía de infrarrojos en suero para la evaluación no invasiva de la fibrosis hepática en pacientes con enfermedad hepática crónica

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la medicina y al diagnóstico. Se refiere a un método para la detección y estadificación de la fibrosis hepática.

Antecedentes de la invención

- 10 La mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por el desarrollo progresivo de fibrosis parenquimatosa que puede conducir a cirrosis y sus complicaciones en fase terminal de hipertensión portal, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. La morbilidad y la mortalidad relacionadas con estas complicaciones son un problema importante de salud pública. En Francia, se ha estimado que alrededor de 15 millones de personas sufren de hepatopatía alcohólica, hepatitis viral crónica B o C y esteatohepatitis no alcohólica.

- 15 En la práctica clínica, la evaluación de la fibrosis hepática es de suma importancia para guiar las estrategias terapéuticas y el seguimiento de los pacientes con enfermedad hepática crónica. Hasta la última década, la biopsia hepática ha sido la referencia para la estadificación del grado de fibrosis. Sin embargo, ahora está claramente establecido que este procedimiento no es un estándar de oro perfecto. Aunque la fibrosis parenquimatosa en respuesta a una lesión hepática crónica afecta a todo el órgano, existe un cierto grado de heterogeneidad y el riesgo de error de muestreo no es despreciable. Se ha demostrado que el examen histopatológico de muestras obtenidas de los lóbulos derecho e izquierdo del hígado durante la laparoscopia dio estadificación de fibrosis discordante en aproximadamente un tercio de los casos. La precisión de la evaluación de la fibrosis depende principalmente del tamaño de la muestra. La variabilidad entre patólogos es otra limitación de la biopsia hepática, aunque este inconveniente está limitado por el uso de un sistema de puntuación histopatológico validado. Además de las limitaciones diagnósticas, la biopsia del hígado es expansiva, lo que obliga a la hospitalización de día y se asocia con tasas significativas de morbilidad y mortalidad.

- 25 Las complicaciones graves (hemoperitoneo, peritonitis biliar y neumotórax) ocurren en aproximadamente 3 de cada 1000 pacientes y la mortalidad se ha estimado entre 1 y 3 en 10 000 pacientes. Por todas estas razones, se han desarrollado pruebas no invasivas como alternativas a la biopsia hepática para la evaluación de la fibrosis hepática.

- 30 Más específicamente, están disponibles ahora varios análisis de sangre (Poynard et al, 2008, Adv. Clin. Chem., 208, 131 - 160). Estas pruebas se basaron en las mediciones de un número limitado de marcadores que participan en la síntesis o degradación de la matriz extracelular (marcadores directos de la fibrosis) o reflejan las consecuencias del daño hepático (marcadores indirectos). Las siguientes patentes pueden ilustrar los métodos descritos en la técnica anterior: documentos WO 08/031051, RU2328744, WO 08/017303, RU2261441, CN1841068, RU2269923, WO 96/26953, US2009/117691 y US2009/11136. Además de los marcadores bioquímicos de la fibrosis, se ha desarrollado otra prueba no invasiva durante los últimos años: elastografía transitoria (de Ledinghen et al, 2008, Gastroenterol. Clin. Biol., 32, 58 - 67) que permite medir la rigidez hepática, un marcador sustitutivo de fibrosis. Sin embargo, el rendimiento de los métodos no invasivos actualmente disponibles es limitado en la diferenciación entre los estadios de fibrosis leve y moderada y en la evaluación del efecto de los tratamientos sobre el proceso de fibrosis hepática. Además, estas pruebas no invasivas se han validado principalmente en pacientes con hepatitis C viral crónica y los datos son insuficientes para validar su desempeño diagnóstico en otras enfermedades hepáticas (Forns, 2008, Gastroenterol Clin Biol, 32, 1-3; http://www.has-sante.fr/portail-upload-docs-application-pdf-diagnostic_cirrhose_-_recommandations.pdf).

- 45 En el campo médico, la espectroscopia infrarroja se ha utilizado en gran medida para estudiar la composición de moléculas y la estructura de las macromoléculas presentes en las células y tejidos. En particular, esta tecnología muestra un interés por el carcinoma cutáneo (Ly et al, Analyst, 2009, 134, 1208-14), linfoma (Babrah et al, 2009, Analyst, 134, 763-8) y el carcinoma de vesícula biliar (Du et al, 2009, Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 8, 75 - 8). Sin embargo, la aplicación de esta tecnología a biofluidos y particularmente al suero ha sido mucho más limitada. La espectroscopia infrarroja en suero se ha utilizado para medir concentraciones de diversas moléculas de proteínas, lípidos y carbohidratos (Ward et al., 1992, Appl. Spectrosc, 46, 959 - 65; Budinova et al, 1997, Appl. Spectrosc, 51, 631 - 5; Werner et al, 1998, Proc. SPIE, 3257, 35 - 41; Shaw et al, 1998, Ann. Clin. Biochem., 35, 624 - 32; Petibois et al., 2002, Jpn J. Physiol., 52, 181 - 90; Petitbois et al., 2000, J. Lab. Clin. Med., 135, 210 - 5; Petibois et al, 1999, Clin. Chem., 45, 1530 - 5). Recientemente, se ha utilizado para el diagnóstico serológico de la encefalopatía espongiiforme (Schmitt et al., 2002, Anal. Chem., 74, 3865 - 8; Martin et al., 2004, Analyst, 129, 897 - 901; documento US2004/126893), adenomas colorrectales (documento WO 05/017501) y artritis reumatoide (Staub et al., 2001, Clin. Chem. Acta, 308, 79-89) y como herramientas pronósticas para evaluar la gravedad de la pancreatitis aguda (Petrov et al., 2007, Pancreatology, 7, 451 - 8, documento RU2284034).

- 55 En el campo de las enfermedades hepáticas, Gordetsov et al han reivindicado en su solicitud de patente N° RU2246897, para poder diagnosticar el cáncer de hígado, la hepatitis y la cirrosis utilizando una metodología basada

en la espectroscopía infrarroja sérica. Sin embargo, la metodología propuesta está defectuosa por una serie de inconvenientes principales:

- 5 - El método propuesto se basa en una muestra de sangre seca suspendida en aceite de vaselina. La presencia de vaselina en la muestra da como resultado picos de absorción adicionales superpuestos a los de la propia muestra de suero, lo que limita el intervalo de longitud de onda explotable que puede analizarse.
- El análisis espectral desarrollado en el documento RU2246897 se reduce a un intervalo de frecuencias estrecha de 1000 a 1200 cm^{-1} . Esto parece ser una consecuencia de la presencia de bandas de interferencia del aceite de vaselina.
- 10 - El cálculo utilizado en el documento RU2246897 se basa en las relaciones de pico a pico. Estos picos se seleccionan subjetivamente en el intervalo de 1000 a 1200 cm^{-1} . Su técnica permitió distinguir la cirrosis versus la ausencia de cirrosis, pero no permitió delinear entre etapas intermedias.

En consecuencia, todavía existe una gran necesidad de desarrollar un método no invasivo para evaluar el grado de fibrosis hepática en un paciente.

Sumario

- 15 Los inventores muestran sorprendentemente que el suero de pacientes con enfermedad hepática crónica presenta características espectrales infrarrojas que permiten determinar el grado de fibrosis hepática (es decir, ausencia de fibrosis hepática o no significativa frente a fibrosis hepática grave). La aplicación médica de esta prueba se refiere a todos los pacientes con enfermedad hepática crónica incluyendo individuos que padecen hepatopatía alcohólica, hepatitis B o C vírica crónica y esteatohepatitis no alcohólica. Por lo tanto, la presente invención es una nueva
- 20 prueba serológica basada en el análisis espectral infrarrojo del suero para detectar fibrosis hepática y determinar el grado/estadio de la fibrosis hepática. En contraste con otros análisis de sangre que se basan en la medición de un número limitado de biomarcadores, el presente método permite el análisis global de todas las características espectrales del suero. La nueva prueba es simple, libre de reactivos y segura ya que sólo requiere una muestra de sangre venosa. En una serie de pacientes con hepatitis C crónica, se demostró que la prueba era capaz de
- 25 discriminar entre pacientes sin fibrosis y aquellos con fibrosis avanzada con una especificidad y sensibilidad muy alta (para ausencia de fibrosis o no significativa: 100% de especificidad y 95,24% de sensibilidad, para fibrosis severa: 95,83% de especificidad y 100% de sensibilidad).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para detectar o estabilizar la fibrosis hepática o para evaluar el grado de fibrosis hepática en un paciente, en particular un paciente con enfermedad hepática crónica, que comprende:

- a) someter una muestra de suero sanguíneo sin reactivo de dicho paciente a espectroscopia infrarroja;
- b) comparar el espectro resultante con espectros de referencia de estadios de fibrosis hepática; y,
- c) asignar el espectro resultante a un espectro de referencia, detectando de este modo y/o haciendo la estadificación de la fibrosis hepática.

35 El espectro resultante se mide en el intervalo de infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} o sub-regiones del mismo.

El grado de fibrosis hepática se selecciona entre ninguna fibrosis hepática o fibrosis hepática no significativa o fibrosis hepática grave.

Preferiblemente, la espectroscopia infrarroja es la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

40 Preferiblemente, el paciente es un paciente que tiene una enfermedad hepática crónica que incluye hepatopatía alcohólica, hepatitis B o C vírica crónica y esteatohepatitis no alcohólica. Más preferiblemente, la enfermedad hepática crónica es la hepatitis viral crónica C.

El método permite determinar si el paciente no tiene fibrosis hepática o tiene fibrosis hepática no significativa o si el paciente tiene una fibrosis hepática grave. Preferiblemente, el espectro resultante se compara con espectros de referencia en subregiones que son máximamente discriminatorias entre pacientes sin fibrosis hepática o fibrosis hepática no significativa y pacientes con fibrosis hepática grave. Más preferiblemente, el espectro resultante se compara y/o se mide en las subregiones más discriminatorias de espectro entre 900 y 1800 cm^{-1} y/o entre 2800 y 3100 cm^{-1} .

Preferentemente, los espectros de referencia se generan mediante las siguientes etapas:

- 50 - medir uno o más espectros en el intervalo infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} para cada muestra de suero sanguíneo a partir de muestras de suero sanguíneo para cada categoría de estadios de fibrosis hepática;

- espectros de pretratamiento por prueba de calidad, cálculo de derivado, normalización de vector y luego prueba de homogeneidad para excluir valores atípicos;
- seleccionar los intervalos de longitudes de onda para una diferenciación óptima de las categorías; y,
- clasificar los espectros para definir un espectro de referencia para cada categoría de estadios de fibrosis hepática.

5 Los primeros pasos de este método pueden ser reemplazados midiendo uno o más espectros en el intervalo infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} para cada muestra de suero sanguíneo a partir de muestras de suero sanguíneo para cada categoría de estadios de fibrosis hepática.

10 En una realización particular, la primera etapa puede comprender proporcionar muestras de suero sanguíneo para cada categoría de estadios de fibrosis hepática; y medir uno o más espectros en el intervalo infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} para cada muestra de suero sanguíneo.

Más preferiblemente, las categorías de estadios de fibrosis hepática se seleccionan del grupo que consiste en F0, F1, F2, F3 y F4 y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se contemplan dos tipos de estadios de fibrosis hepática, siendo la primera categoría sin fibrosis hepática o la fibrosis no significativa, y la segunda categoría una fibrosis hepática grave.

15 Más preferiblemente, se proporcionan al menos 10 muestras diferentes para cada categoría de estadios de fibrosis hepática.

20 Más preferiblemente, la selección de la longitud de onda para la diferenciación óptima de las categorías se lleva a cabo utilizando una prueba F de estadística univariable, comparando la varianza entre y dentro de las clases independientemente para cada longitud de onda. Las longitudes de onda con los valores F más altos o el valor F por encima de un nivel predefinido se seleccionan para la clasificación espectral.

Más preferiblemente, la etapa de clasificación de los espectros para definir un espectro de referencia se lleva a cabo con máquinas de vector de soporte (SVM).

Descripción detallada

25 El procedimiento de la invención combina las ventajas de la tecnología de medición espectroscópica infrarroja por transformada de Fourier con una evaluación matemática dedicada del contenido de información de los espectros. La estandarización de la adquisición espectral de suero y el desarrollo de modelos matemáticos y estadísticos han permitido validar un procedimiento para la clasificación de una muestra de suero en diferentes clases de fibrosis hepática. En resumen, la primera etapa de la invención era normalizar la adquisición de espectros infrarrojos a partir de suero. Posteriormente, se desarrolló un protocolo de análisis espectral para clasificar espectros en diferentes clases de fibrosis hepática. El segundo paso es la creación de una base de datos de referencia utilizando muestras de suero de pacientes con estadios conocidos de fibrosis hepática. Los espectros de referencia se clasifican en diferentes clases por medio de métodos de clasificación matemática, tales como procesos estadísticos multivariados de reconocimiento de patrones, redes neuronales, máquinas vectoriales de apoyo y métodos de clasificación basados en casos o aprendizaje mecánico, algoritmos genéticos o métodos de programación evolutiva.

35 Entonces, la asignación de un nuevo espectro de muestra desconocido para el diagnóstico a una clase dada de espectros de referencia puede ser hecha por el clasificador o una combinación de clasificadores como redes neuronales artificiales y máquinas de vector de soporte. También son adecuados los procesos basados en la función de densidad de probabilidad, la matriz de correlación, los métodos de clasificación basados en casos o el aprendizaje automático, los algoritmos genéticos o los métodos de programación evolutiva. El sistema de clasificación consta de varias subunidades con una estructura en árbol, en la que las tareas de clasificación se dividen en tareas parciales y los sistemas de clasificación individuales en una unidad se combinan para formar un sistema de clasificación jerárquico en el que todas las etapas de la jerarquía son procesos automáticamente durante el curso de la evaluación.

45 Con respecto al método descrito en el documento RU 2246897, el presente método supera los inconvenientes. De hecho, el método descrito en la presente invención evita el problema de picos de absorción adicionales puesto que no necesita ninguna matriz adicional como la vaselina para suspender la muestra de suero. Como resultado, la firma espectral es específica para la muestra de suero sin ningún contaminante. En el presente método, el espectro obtenido cubre toda el intervalo de frecuencias del infrarrojo medio de 4000 a 400 cm^{-1} (sin bandas de interferencia) y el análisis estadístico demuestra que las frecuencias discriminatorias están presentes en dos subregiones, es decir, 2800-3100 cm^{-1} y 900-1800 cm^{-1} . Estas longitudes de onda discriminatorias no pudieron ser identificadas en el método descrito en el documento RU2246897 reducido a un intervalo de frecuencia estrecho de 1000 a 1200 cm^{-1} . Por último, en el presente método, la selección de frecuencias discriminatorias se basa en pruebas estadísticas robustas y, a diferencia del documento RU2246897, el análisis de datos se basa en métodos quimiométricos validados. Estos métodos que tienen en cuenta todas las variables, permitieron la discriminación de las diferentes etapas de la fibrosis hepática.

El procedimiento descrito por la invención se puede realizar igualmente bien con espectroscopia IR (infrarroja), espectroscopia FT-IR (espectroscopia de transformada de Fourier infrarroja), espectroscopia Raman y espectroscopia FT-Raman (Transformada de Fourier Raman). En una realización preferida, el método utiliza espectroscopia FT-IR (Transformada de Fourier de infrarrojos).

5 Muestra - La muestra es una muestra de suero obtenida, por ejemplo, después de la separación del suero por centrifugación de un muestreo de sangre venosa. La muestra de suero se puede analizar inmediatamente o almacenarse a -80°C para un análisis posterior. La congelación del suero permite enviar a los centros expertos para el análisis espectral.

10 Paciente - El paciente puede ser un mamífero o un ser humano, preferiblemente es un ser humano. Más preferiblemente, el paciente tiene una enfermedad hepática crónica. Dicha enfermedad hepática crónica incluye, pero no se limita a, hepatopatía alcohólica, hepatitis B o C crónica viral y esteatohepatitis no alcohólica. En una realización más preferida, la enfermedad hepática crónica es la hepatitis C crónica.

15 Estadificación de la fibrosis - Cinco estadios de la fibrosis son generalmente admitidos. La primera etapa, llamada F0, se refiere a ninguna fibrosis. La segunda etapa, llamada F1, se refiere a la fibrosis portal sin septa. La etapa intermedia, llamada F2, se refiere a la fibrosis portal con septos raros y se considera fibrosis significativa. Las dos últimas etapas, llamadas F3 y F4, se refieren respectivamente a numerosos septos sin cirrosis y con cirrosis y se consideran fibrosis hepática grave. En la muestra utilizada para generar la base de datos de referencia, la fibrosis hepática se puede determinar preferiblemente mediante una combinación de pruebas actualmente disponibles para la fibrosis hepática ((Smith et al., 2009, Aliment. Pharmacol. Ther. 30, 557-576; Poynard et al., 2008, Adv. Clin. Chem., 208, 131 - 60). El método de la invención puede permitir la evaluación de la espectroscopia IR, en particular espectroscopia FT-IR, del grado de fibrosis hepática de acuerdo con la estadificación METAVIR.

25 Espectroscopia infrarroja - Se realiza la adquisición estandarizada de espectros infrarrojos. Como se mencionó anteriormente, la técnica de muestreo utilizada en la presente memoria no requiere la suspensión de la muestra de suero en aceite de vaselina antes del análisis por infrarrojos. Por lo tanto, el método es más directo e incluye el secado de una alícuota diluida. Por consiguiente, la muestra de suero a someter a espectroscopia infrarroja es preferiblemente una alícuota seca de la muestra de suero, en particular sin ninguna adición de matriz (p. ej. aceite de vaselina). El análisis infrarrojo de alto rendimiento de las muestras puede llevarse a cabo utilizando multicubetas o cubetas de flujo, soportes de muestras que se usan para placas de microtitulación o bien empleando técnicas microespectrométricas. En una realización preferida, se utiliza una placa de silicio como soporte de muestras. Por ejemplo, después de la dilución, se depositan de 5 a 15 microlitros sobre una placa de silicio (384 ó 96 pocillos). Preferiblemente, los diámetros de las áreas de muestra a través de las cuales pasa la radiación son de 10 a 12 mm, más preferiblemente de 1 a 5 mm. Después del secado al aire, los espectros son adquiridos en el modo de transmisión. Cada espectro se registró en el intervalo de longitud de onda de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ a una resolución de 4 cm^{-1} y se promedió en 32 exploraciones. Opcionalmente, la generación y medición del espectro infrarrojo se lleva a cabo en una disposición que tiene transmisión/absorción o reflexión total atenuada o reflexión directa o difusa o con técnicas de conductor de luz IR. Un espectrómetro Tensor 27 acoplado al módulo HTS-XT (Bruker® Optics, Etlingen, Alemania) puede usarse convenientemente para medir el espectro. Preferiblemente, para cada muestra, se miden varios espectros infrarrojos. Preferiblemente, se miden más de 5 espectros, por ejemplo 5, 10 ó 20 espectros. Preferiblemente, los datos brutos se someten a continuación a un ensayo de calidad espectral para eliminar los espectros "periféricos". La prueba de calidad puede incluir la verificación de la intensidad de la señal, la relación señal/ruido y la ausencia de agua residual. Además, este paso también puede incluir una prueba de homogeneidad con el Análisis Clusterizado Jerárquico (HCA) sin agrupación. El siguiente paso es el pre-procesamiento espectral con el fin de aumentar el contraste espectral. Esto puede hacerse mediante el cálculo de derivados, filtrado, supresión de ruido o reducción de datos mediante transformación de ondículas o análisis factorial. En una realización particular, el pretratamiento de espectros incluye la corrección de la línea de base, la primera derivación y la normalización del vector, (por ejemplo con el software OPUS 6 de Bruker®).

40 Análisis espectral - La creación de una base de datos de referencia utilizando muestras de suero de pacientes con estadios conocidos de fibrosis hepática es el requisito previo para el análisis espectral de una muestra desconocida. Las categorías contempladas de estadios de fibrosis hepática se seleccionan del grupo que consiste en F0, F1, F2, F3 y F4 y combinaciones de los mismos. Más particularmente, se contemplan dos categorías de estadios de fibrosis hepática: la primera categoría no es fibrosis ni fibrosis hepática no significativa, correspondiente a los estadios F0 y F1; y la segunda categoría es una fibrosis hepática grave, correspondiente a las etapas F3 y F4. Preferiblemente, para cada categoría de estadios de fibrosis hepática se proporcionan al menos 10 muestras diferentes, por ejemplo entre 10 y 100 muestras diferentes, preferiblemente entre 20 y 50 muestras diferentes. Por supuesto, el mayor número de muestras diferentes es el mejor.

50 La selección de los intervalos de longitudes de onda utilizados para la diferenciación óptima de las clases ("selección de características") puede realizarse mediante procedimientos estadísticos multivariados, tales como análisis de varianza, análisis de covarianza, análisis factorial, dimensiones de distancia estadística, tales como la distancia euclidiana o la distancia de Mahalanobis, o una combinación de estos métodos juntos con un proceso de optimización tales como algoritmos genéticos. Por ejemplo, el paso de seleccionar los intervalos de longitudes de onda para una diferenciación óptima de las categorías puede llevarse a cabo usando un algoritmo basado en

ANOVA para evaluar el valor discriminante de cada longitud de onda única. Este método, basado en estadísticas F univariadas, compara la varianza entre y dentro de las clases independientemente para cada característica. Por ejemplo, las sub-regiones de espectro entre 900 y 1800 cm^{-1} y/o entre 2800 y 3100 cm^{-1} han sido identificadas por los inventores como las más discriminatorias y el espectro resultante se compara preferentemente y/o se mide en estas subregiones.

Debe tenerse en cuenta que la selección de la longitud de onda se utiliza como una etapa de preprocesamiento para reducir en primer lugar el número de variables. La clasificación se lleva a cabo utilizando un clasificador multivariado que, en fin, puede incorporar otras variables discriminantes. La clasificación multivariable es más potente que el uso de un enfoque univariado como las intensidades de pico o la relación de las intensidades de pico.

Varias redes neuronales sintéticas se pueden utilizar como una red de alimentación directa con tres capas y un método de gradiente decente como el algoritmo de aprendizaje. El sistema de clasificación puede mostrar una estructura de árbol en la que las tareas de clasificación se dividen en tareas parciales y los sistemas de clasificación individuales en una unidad se combinan para formar un sistema de clasificación jerárquica en el que todas las etapas de la jerarquía se procesan automáticamente durante el curso de la evaluación. Las etapas individuales de los sistemas de clasificación pueden tomar la forma de redes neuronales o máquinas vectoriales de apoyo o una combinación de ambas que han sido optimizadas para tareas especiales. También se pueden aplicar máquinas vectoriales de apoyo como sistema de clasificación que forma clasificadores robustos o combinación de clasificadores. En particular, los intervalos de longitud de onda identificados pueden procesarse convenientemente por medio de clasificación matemática tal como máquinas de vector de soporte (SVM). Preferiblemente, la etapa de clasificar los espectros para definir un espectro de referencia se lleva a cabo con máquinas de vectores de soporte (SVM).

La creación de la base de datos de referencia para la caracterización y/o identificación de la fibrosis hepática debe llevarse a cabo sólo una vez. También existe la posibilidad de extender la base de datos en cualquier momento. Esto puede hacerse, por ejemplo, añadiendo más muestras definidas a las clases ya contenidas en la base de datos. Aparte de esto, la base de datos de referencia también puede ampliarse para incluir otras enfermedades no contenidas hasta ahora en la base de datos, lo que puede causar interpretación cruzada. En tales casos, la base de datos debe reorganizarse como se ha descrito anteriormente, por lo que no es necesario volver a crear los registros de datos espectrales ya utilizados para la creación de la base de datos anterior, siempre y cuando se utilicen las mismas muestras y las condiciones de la muestra y los parámetros de medición espectral no se cambian.

La asignación de un nuevo espectro de muestra desconocido para detectar y/o clasificar la fibrosis hepática a una, dos o más clases de espectros de referencia puede realizarse mediante métodos de clasificación matemática basados en el reconocimiento de patrones. Los métodos que permiten la clasificación simultánea en varias clases, como es el caso de la clasificación por medio de máquinas vectoriales de apoyo y redes neuronales artificiales, son particularmente adecuados para la clasificación automatizada y eficiente de varias clases. También son adecuados los procesos basados en la función de densidad de probabilidad, la matriz de correlación, los métodos de clasificación basados en casos o el aprendizaje automático, los algoritmos genéticos o los métodos de programación evolutiva.

El sistema de clasificación puede consistir en varias subunidades con una estructura en árbol, en la que las tareas de clasificación se dividen en tareas parciales y los sistemas de clasificación individuales en una unidad se combinan para formar un sistema de clasificación jerárquico en el que todas las etapas de la jerarquía se procesan automáticamente durante el curso de la evaluación.

Una vez establecido el espectro de referencia para cada categoría de estadios de fibrosis hepática, se pueden utilizar los espectros de muestras para los que se conoce la etapa de fibrosis hepática para validar el espectro de referencia.

Los siguientes ejemplos se dan con fines de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLO

A continuación se describe un estudio clínico que se realizó con el método según la invención. El objetivo de este estudio fue demostrar que el análisis FT-IR de suero de pacientes con hepatitis crónica C permite la clasificación de muestras según el grado de fibrosis hepática evaluado por el análisis de sangre FibroTest.

50 Materiales y métodos

Muestras de suero

Este estudio se realizó a partir de un banco de muestras de suero almacenadas a -80°C , originalmente tomadas para un FibroTest en pacientes con hepatitis C crónica (Unidad de Bioquímica del Hospital Universitario de Reims). Los archivos del paciente fueron examinados retrospectivamente. Los criterios de selección fueron los siguientes: 1) presencia de anticuerpos séricos del virus de la hepatitis C (VHC), 2) presencia de ARN del VHC en suero mediante la reacción en cadena de la polimerasa, 3) ausencia de antígeno de superficie sérico de la hepatitis B, 4) ausencia

de anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana sérica 5) ausencia de enfermedad hepática coexistente, 6) ausencia de consumo excesivo de alcohol (por encima de 50 g/día) y 7) grado de fibrosis evaluado en F0 o F3-F4 en la puntuación METAVIR por el FibroTest realizado en condiciones estandarizadas, como que figuran en las recomendaciones técnicas de la empresa de comercialización de la prueba (www.biopredictive.com). Veintitrés muestras de suero fueron seleccionadas según los criterios anteriores: 12 de pacientes con fibrosis hepática FO y 11 de pacientes con fibrosis F3-F4. Los datos clínicobiológicos siguientes fueron recogidos de los archivos de estos pacientes: demografía, genotipo del virus C, valores individuales de los 5 biomarcadores de Fibrotest, albúmina sérica, tiempo de protrombina y recuento de plaquetas. Además, se realizaron otras tres pruebas no invasivas de fibrosis hepática cuando se disponía de marcadores séricos: la puntuación APRI basada en el nivel sérico de aspartato aminotransferasa y el recuento de plaquetas, la puntuación FORNS basada en la gamma-glutamilttransferasa sérica, el colesterol, el número de plaquetas y la edad y la puntuación Fib-4 basado en la aspartato aminotransferasa sérica y los niveles de alanina aminotransferasa, el recuento de plaquetas y la edad. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética local del Hospital Universitario de Reims.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Después de descongelar, cada muestra de suero se diluyó 2 veces y se depositaron 10 alícuotas de 5 microlitros en los pocillos de una placa de silicona de 96 pocillos. El análisis de 10 alícuotas por muestra permitió la detección de espectros atípicos que pueden deberse a variaciones en el procedimiento de muestreo o en las propiedades superficiales de la placa de silicona y/o de la propia muestra de suero. Después de 30 minutos de secado al aire, la placa se transfirió a un espectrómetro FT-IR (tensor 27, Bruker Optics GmbH, Alemania) acoplado a un sistema de alto rendimiento (HTS-XT, Bruker Optics GmbH, Alemania). Los espectros FT-IR de las muestras se adquirieron en el modo de transmisión. Cada espectro se registró en el intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , a una resolución física nominal de 4 cm^{-1} y promediado en 32 exploraciones. Se aplicó un factor de llenado cero de 2 y se utilizó una función de 3 términos de Blackmann-Harris para la transformación de Fourier. Los espectros se obtuvieron utilizando el software de adquisición de datos OPUS (versión 6.0, Bruker Optics GmbH, Alemania).

A continuación, los espectros se sometieron a un ensayo de calidad para comprobar el umbral de intensidad de absorbancia, la relación señal/ruido y la presencia de contenido de vapor de agua. Los espectros que pasaron la prueba de calidad fueron corregidos para el fondo del portador de muestra, convertidos a las primeras derivadas utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay con nueve puntos de suavizado y vector normalizado en el rango completo. Esto se realizó con el software OPUS (versión 3, Bruker Optics GmbH, Alemania). Finalmente, la homogeneidad de los datos se analizó mediante análisis de agrupamientos jerárquicos para excluir los valores atípicos.

Análisis estadístico

Los datos clínicobiológicos se recopilaron utilizando el software Epi Info versión 3.4. Los datos cuantitativos se expresaron como mediana e intervalo y se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Los datos cualitativos se expresaron como porcentaje y se compararon utilizando la prueba de Khi 2. Se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05.

El análisis espectral se realizó en dos etapas. En una primera etapa, se realizó una selección de longitud de onda como una etapa de preprocesamiento para reducir la redundancia en los datos y mejorar la clasificación. Esta reducción de datos se obtuvo utilizando un algoritmo basado en ANOVA para evaluar el valor discriminante de cada longitud de onda en sub-regiones espectrales entre 900 y 1800 cm^{-1} y entre 2800 y 3100 cm^{-1} . Este método, basado en la F-estadística univariable, compara la varianza entre y dentro de las clases independientemente para cada característica (Udelhoven et al, 2003, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 66, 219-226). Un algoritmo multivariado basado en el análisis de covarianza no se realizó en este estudio dado el pequeño número de muestras. Los valores de F se clasificaron en orden ascendente y se utilizaron las 70 longitudes de onda con los valores más altos para la clasificación de espectros. Después de la reducción de los datos, el segundo paso fue aplicar el modelo de clasificación supervisado máquina de vector de soporte (SVM) para clasificar los espectros en 2 clases: espectros de pacientes con fibrosis FO y espectros de aquellos con fibrosis F3-F4. La sensibilidad y especificidad del clasificador se calculó para todos los espectros y para el subconjunto de espectros excluyendo valores atípicos.

Resultados

Características del Paciente

Las características clínicobiológicas se resumen en la tabla 1. Los pacientes con fibrosis extensa (METAVIR F3-F4) fueron significativamente mayores y fueron más frecuentemente varones que los pacientes sin fibrosis (METAVIR FO). No hubo diferencias significativas en los marcadores séricos de insuficiencia hepatocelular (albúmina y tiempo de protrombina). Ningún paciente tuvo trombopenia aunque el recuento de plaquetas fue significativamente menor en pacientes con fibrosis extensa en comparación con aquellos sin fibrosis (tabla 1).

En la tabla 2 se muestran los resultados de otras 3 pruebas no invasivas de fibrosis hepática (puntuaciones de APRI, Forns y FIB4). De acuerdo con el FibroTest, estas puntuaciones fueron significativamente mayores en pacientes con

fibrosis extensa que en pacientes sin fibrosis. Sin embargo, hubo una superposición entre los valores más bajos en el grupo de pacientes F3-F4 y los valores más altos en el grupo de pacientes F0 (tabla 2).

Análisis espectral

5 Todos los espectros cumplieron con la prueba de calidad. Once de ellos fueron asignados como valores atípicos por análisis de conglomerados: 7 en el grupo de pacientes con fibrosis F0 y 4 en el grupo de pacientes con fibrosis F3-F4. El análisis de agrupamiento individual para cada 10 mediciones repetidas mostró las mismas propiedades de inhomogeneidad dentro de los grupos. Sobre la base de estos resultados, se crearon 2 conjuntos de datos con 2 clases (fibrosis F0/fibrosis F3-F4): conjunto de datos 1 que contenía todos los 230 espectros y conjunto de datos 2 que contenían un subconjunto que excluía los 11 espectros atípicos antes mencionados. El análisis espectral se realizó por separado en estos dos conjuntos de datos.

10 Cuando se aplicó el modelo de clasificación supervisado SVM a todos los espectros (conjunto de datos 1), la sensibilidad y la especificidad totales fueron respectivamente 90,1% y 100% para la clasificación correcta de los espectros de pacientes con fibrosis F3-F4 y 100% y 92,3% para espectros de pacientes con fibrosis F0. La tasa de exactitud total en este conjunto de datos fue de 95,65% (tabla 3). Cuando la SVM se aplicó al subconjunto de 219 espectros (conjunto de datos 2), la sensibilidad y la especificidad totales fueron respectivamente 95,2% y 100% para la clasificación correcta de los espectros de pacientes con fibrosis F3-F4 y 100% y 95,8% para los espectros de pacientes con fibrosis F0. La tasa de exactitud total en este conjunto de datos fue de 97,7% (tabla 3).

15 Tabla 1. Características clínicobiológicas de pacientes sin fibrosis (METAVIR FO) o fibrosis extensa (METAVIR F3F4) según FibroTest. Los datos se expresan como mediana [intervalo], n: número de pacientes, GGT: gamma-glutamilttransferasa, TP: tiempo de protrombina.

	Pacientes sin fibrosis (METAVIR FO) n = 12	Pacientes con fibrosis extensa (METAVIR F3F4) n = 11	valor p
Edad	43 [33 - 60]	61 [45 - 70]	0,0028
Género (M/F)	4/8	7/4	
Genoma del virus C (%)			
1	36,4 (n = 4)	54,5 (n = 6)	
1a	9,1 (n = 1)	18,2 (n = 2)	
1b	27,3 (n = 3)	27,3 (n = 3)	
3	9,1 (n = 1)	0 (n = 0)	
4	18,2 (n = 2)	0 (n = 0)	
Puntuación Fibrotest	0,15 [0,04-0,21]	0,80 [0,69-0,93]	
α2macroglobulina (g/l)	1,99 [1,21 - 2,56]	3,86 [3,19 - 5,79]	<10 ⁻⁵
Bilirrubina total (μmol/l)	8,50 [6-13]	14,50 [8-20]	0,0025
Haptoglobina (g/l)	1,02 [0,20 - 2,0]	0,53 [0,24 - 1,46]	0,074
Apolipoproteína A1 (g/l)	1,98 [1,07 - 2,97]	1,41 [1,03 - 1,97]	0,0164
GGT (U/l)	29 [12 - 72]	73 [25 - 314]	0,0019
Albumina (g/l)	42 [36 - 52] ¹	42 [37 - 50]	0,79
PT (%)	101 [88 - 15] ²	95 [65 - 140] ³	0,35
Recuento de plaquetas (G/L)	276 [201 - 378]	165 [155 - 298]	0,012

¹9 pacientes, ²8 pacientes, ³10 pacientes.

20 Tabla 2. Resultados de las tres pruebas no invasivas de fibrosis hepática en dos grupos de pacientes sin fibrosis (METAVIR FO) o fibrosis extensa (METAVIR F3F4) según FibroTest. Los datos se expresan como mediana [intervalo], n = número de pacientes.

ES 2 643 121 T3

	Pacientes sin fibrosis (METAVIR F0)	Pacientes con fibrosis extensiva (METAVIR F3F4)	valor P
Puntaje APRI	0,31 [0,12-0,68] n = 12	0,70 [0,40-2,21] n = 11	0,0006
Puntuación FORNS	3,26 [1,94-5,30] n = 10	5,85 [4,60-7,13] n = 9	0,0004
Puntuación Fib-4	0,82 [0,54-1,85] n = 12	2,14 [1,00-4,60] n = 11	0,0007

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del modelo de clasificación SVM aplicado a todos los espectros (conjunto de datos 1) y un subconjunto de 219 espectros excluyendo valores atípicos (conjunto de datos 2).

	Conjunto de datos 1	Conjunto de datos 2
Pacientes sin fibrosis (METAVIR F0) (n = 12)		
Sensibilidad	100%	100%
Especificidad	92,31%	95,83%
Pacientes con fibrosis extensa (METAVIR F3F4) (n = 11)		
Sensibilidad	90,91%	95,24%
Especificidad	100%	100%

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el grado de fibrosis hepática en un paciente que comprende:
 - a) someter una muestra de suero sanguíneo exenta de reactivo de dicho paciente a espectroscopia infrarroja;
 - b) comparar el espectro resultante con espectros de referencia de estadios de fibrosis hepática; y,
- 5 c) asignar el espectro resultante a un espectro de referencia, detectando de este modo y/o estadificando la fibrosis hepática,
 en el que el espectro resultante se mide en el intervalo infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} o sub-regiones del mismo, y en el que el grado de la fibrosis hepática se selecciona de ninguna fibrosis hepática o fibrosis hepática no significativa o fibrosis hepática grave.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la espectroscopia infrarroja es espectroscopia FT-IR (transformada de Fourier infrarroja).
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el paciente es un paciente que tiene una enfermedad hepática crónica, incluyendo hepatopatía alcohólica, hepatitis B o C vírica crónica y esteatohepatitis no alcohólica.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el espectro resultante se compara con espectros de referencia en subregiones que son máximamente discriminatorias para los estadios de fibrosis hepática.
5. El método según la reivindicación 4, en el que el espectro resultante se compara y/o se mide en las subregiones más discriminatorias del espectro entre 900 y 1800 cm^{-1} y/o entre 2800 y 3100 cm^{-1} .
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los espectros de referencia se generan mediante las siguientes etapas:
 - medir uno o más espectros en el intervalo infrarrojo de 400 a 4000 cm^{-1} para cada muestra de suero sanguíneo exenta de reactivos procedente de muestras de suero sanguíneo libres de reactivos para cada categoría de estadios de fibrosis hepática;
 - espectros de pretratamiento por prueba de calidad, cálculo de derivado, normalización de vector y luego prueba de
- 25 homogeneidad para excluir valores atípicos;
 - seleccionar los intervalos de longitudes de onda para una diferenciación óptima de las categorías; y,
 - clasificar los espectros para definir un espectro de referencia para cada categoría de estadios de fibrosis hepática.
7. El método según la reivindicación 6, en el que las categorías de etapas de fibrosis hepática se seleccionan del grupo que consiste en F0, F1, F2, F3 y F4 y combinaciones de los mismos.
- 30 8. El método según la reivindicación 7, en el que se contemplan dos categorías de etapas de fibrosis hepática, siendo la primera categoría ninguna fibrosis o fibrosis hepática no significativa, y la segunda categoría una fibrosis hepática grave.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que se proporcionan al menos 10 muestras diferentes para cada categoría de etapas de fibrosis hepática.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la etapa de selección de los intervalos de longitud de onda para la diferenciación óptima de las categorías se lleva a cabo con la prueba estadística F.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la etapa de asignar los espectros a un espectro de clase definido se lleva a cabo con máquinas de vector de soporte (SVM).