

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 758**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2015 PCT/EP2015/058772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162200**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015 E 15720014 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 3134543**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar fibrosis hepática**

30 Prioridad:

23.04.2014 EP 14305597

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

04.10.2018

73 Titular/es:

**VAIOMER (33.3%)
516 Rue Pierre et Marie Curie, Prologue Biotech
31670 Labège, FR;
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR
VERGATA (33.3%) y
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE GIRONA DR. JOSEP TRUETA
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**COURTNEY, MICHAEL;
LELOUVIER, BENJAMIN;
FEDERICI, MASSIMO;
FERNÁNDEZ-REAL, JOSÉ MANUEL y
PAÏSSÉ, SANDRINE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 684 758 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

Procedimiento para diagnosticar fibrosis hepática

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos para diagnosticar la fibrosis hepática en un sujeto que padece obesidad, o para seleccionar un sujeto que padece obesidad para la biopsia hepática o para el tratamiento. La presente invención también se refiere a procedimientos para seleccionar un probiótico, un prebiótico, un compuesto químico o un compuesto biológico adecuado para evitar y/o tratar la fibrosis hepática.
- 10 **[0002]** El hígado es el primer órgano extraintestinal que se encuentra con sangre venosa del intestino delgado y grueso a través de la vena porta. En un organismo sano, solo pequeñas cantidades de productos bacterianos translocados llegan al hígado. En general, el sistema inmunitario hepático tolera estos productos bacterianos, evitando respuestas dañinas, un fenómeno conocido como "tolerancia hepática". A este respecto, el hígado no solo consiste en hepatocitos parenquimatosos, sino que también contiene células no parenquimatosas
- 15 que incluyen células inmunitarias y no inmunitarias. Los miembros del sistema inmunitario hepático son macrófagos del tejido hepático residentes (células de Kupffer), células asesinas naturales (NK), células NKT, células T y células B. Estos tipos de células regulan estrictamente el sistema inmunitario del hígado, incluida la tolerancia hepática.
- [0003]** Varias líneas de evidencia sugieren que la translocación bacteriana juega un papel significativo en las enfermedades hepáticas alcohólicas. Se ha observado que el deterioro de la función de las uniones intestinales estrechas y la proliferación bacteriana en el intestino inducida por el alcohol y/o sus metabolitos, como el acetaldehído, mejora la translocación bacteriana al hígado. Esto, a su vez, conduce a la activación de las células inmunitarias, incluidas las células de Kupffer, y la liberación de varias citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. Además, se ha observado que existe una expresión intestinal reducida de las proteínas antimicrobianas Reg3b y
- 25 Reg3g en animales y pacientes con consumo crónico de etanol, lo que sugiere que la disbiosis intestinal inducida por etanol está mediada por la desregulación de la expresión de moléculas antimicrobianas.
- [0004]** En la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), también existe evidencia del papel de la translocación bacteriana en el hígado. En primer lugar, se ha demostrado el papel de la flora intestinal en la obesidad. Cuando los ratones sin gérmenes de tipo salvaje alimentados con una dieta equilibrada comercial para roedores fueron colonizados con una microbiota recolectada de donantes ob/ob o magros, la adiposidad en los receptores de la microbiota "obesa" aumentó más que en los receptores de una microbiota "magra", lo que indica un papel crucial de la microbiota en la obesidad y, por lo tanto, en la esteatosis hepática. Sin embargo, para conocimiento de los inventores, nunca se ha establecido una correlación entre la translocación bacteriana en el hígado, o incluso en la
- 35 circulación sanguínea, de un sujeto y la presencia de fibrosis hepática en dicho sujeto.
- [0005]** La fibrosis hepática es un problema de salud importante con una mortalidad mundial atribuible a cirrosis y cáncer primario de hígado de alrededor de 1,5 millones de muertes por año. La cirrosis es la última etapa de la fibrosis que ocurre principalmente en respuesta a ataques virales y tóxico-metabólicos. Las causas más
- 40 comunes de progresión de la fibrosis son la hepatitis C crónica, la hepatitis B crónica, la hepatopatía alcohólica y la esteatosis hepática no alcohólica. La fibrosis hepática es tratable, incluso en la etapa cirrótica, principalmente utilizando tratamientos antivirales para la hepatitis C y B, pero también al reducir el consumo de alcohol y mejorar el sobrepeso, la diabetes y los factores metabólicos para la esteatosis hepática no alcohólico.
- 45 **[0006]** Por lo tanto, es deseable el cribado de la fibrosis hepática. La biopsia hepática es el estándar para diagnosticar la fibrosis hepática y para diagnosticar el trastorno hepático subyacente que causa fibrosis. Sin embargo, la biopsia hepática es invasiva, dando como resultado un riesgo del 10 al 20 % de complicaciones menores (por ejemplo, dolor posterior al procedimiento) y un riesgo del 0,5 al 1 % de complicaciones graves (por ejemplo, hemorragia importante). Además, la biopsia hepática está limitada por el error de muestreo y el acuerdo
- 50 imperfecto entre observadores en la interpretación de los hallazgos histológicos. Por lo tanto, la biopsia hepática no siempre se puede hacer y se necesitan procedimientos alternativos no invasivos para diagnosticar la fibrosis hepática.
- [0007]** La presente invención surge en primer lugar del hallazgo inesperado de los inventores de que la
- 55 concentración en sangre del ADNr 16S bacteriano se correlaciona específicamente con la presencia de fibrosis hepática en pacientes que padecen obesidad, mientras que no está correlacionada con otro tipo de enfermedades de hígado graso, como por ejemplo la esteatosis hepática. La concentración en sangre del ADNr 16S bacteriano puede, por lo tanto, ser útil en el diagnóstico de la fibrosis hepática en pacientes que padecen obesidad.

[0008] La presente invención se refiere así a un procedimiento, en particular un procedimiento in vitro, para diagnosticar la fibrosis hepática en un sujeto que padece obesidad, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

5 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano a la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) según en el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad.

10

[0009] La presente invención también se refiere a un procedimiento, en particular un procedimiento in vitro, para seleccionar un sujeto que padece obesidad para biopsia hepática, comprendiendo dicho procedimiento los pasos de:

15 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para que se someta a una biopsia hepática.

20

[0010] De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto que padece obesidad para un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

25 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para someterse a un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.

30

[0011] Otro aspecto de la presente descripción es un procedimiento para tratar un sujeto obeso que padece fibrosis hepática, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

35 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto;

b) según el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar la fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad; y

40 c) administrar al sujeto un tratamiento dirigido a la fibrosis hepática, si se ha diagnosticado fibrosis hepática en la etapa b).

[0012] La descripción se refiere además a un procedimiento para tratar a un sujeto que padece obesidad y a partir de fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

45

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto;

50 b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para someterse a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones; y

c) administrar al sujeto seleccionado en la etapa b) un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.

55 **[0013]** La invención también se refiere a un procedimiento in vitro para monitorizar la capacidad de respuesta de un paciente que padece obesidad y de fibrosis hepática y/o sus complicaciones a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la

cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) en función del resultado de la medición en el paso a1), controlar la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento farmacológico.

5

[0014] La concentración en sangre del ADNr 16S bacteriano refleja la causa de la enfermedad más que su consecuencia, y por lo tanto puede ser útil como un biomarcador acompañante para estrategias terapéuticas dirigidas a la microbiota intestinal, tales como pre y probióticos.

10 **[0015]** De acuerdo con esto, la presente invención finalmente se refiere a un procedimiento para explorar un probiótico, un prebiótico, un compuesto químico o un compuesto biológico adecuado para prevenir y/o tratar la fibrosis hepática, que comprende las etapas de:

- medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la
15 cantidad de ADN total, en una muestra biológica de un sujeto obeso que padece fibrosis hepática que ha sido tratado con el candidato probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico; y

- comparar dicha concentración, o dicha relación, con la de un sujeto obeso de control que padece fibrosis hepática que no ha sido tratado con dicho candidato probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico;

20

donde una concentración más alta, o una relación más alta, medida en la muestra biológica del sujeto de control que en la muestra biológica del sujeto tratado con el probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato, indica que dicho candidato probiótico, prebiótico, químico compuesto o compuesto biológico es adecuado para evitar y/o tratar la fibrosis hepática.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Fibrosis

30 **[0016]** Como se usa en el presente documento, los términos "fibrosis", "fibrosis del hígado" o "fibrosis hepática" se refieren a un estado médico en el que se acumula un exceso de tejido conectivo en el hígado; este tejido representa cicatrización en respuesta a una lesión crónica y repetida de las células hepáticas. Comúnmente, la fibrosis progresa, alterando la arquitectura hepática y finalmente la función, ya que los hepatocitos en regeneración intentan reemplazar y reparar el tejido dañado.

35

Sujeto

[0017] En el contexto de la presente invención, un "sujeto" denota un mamífero humano o no humano, tal como un roedor (rata, ratón, conejo), un primate (chimpancé), un felino (gato), o un canino (perro). Preferiblemente, el sujeto es humano. El sujeto de acuerdo con la invención puede ser en particular un hombre o una mujer.

40

[0018] De acuerdo con la presente invención, el sujeto padece obesidad.

[0019] Como se usa en el presente documento, el término "obesidad", "obesidad general" u "obesidad en general" se refiere a una condición médica en la que el exceso de grasa corporal se ha acumulado en la medida en que puede tener un efecto adverso para la salud, que reduce la esperanza de vida y/o aumenta los problemas de salud. La obesidad general se determina típicamente mediante la evaluación del índice de masa corporal (IMC), una medida que asocia el peso y la altura. En particular, las personas se definen como sobrepeso si su IMC está entre 25 kg/m² y 30 kg/m², y las personas obesas cuando es mayor de 30 kg/m².

50

[0020] En el contexto de la invención, el sujeto tiene preferiblemente un índice de masa corporal (IMC) mayor de 30 kg/m², más preferiblemente de 37,5 kg/m², o incluso más preferiblemente mayor de 40 kg/m².

[0021] En el contexto de la invención, el término "obesidad abdominal", "obesidad central" o "grasa del vientre" se refiere a la obesidad en la que existe una acumulación específica de grasa abdominal que da como resultado un aumento en el tamaño de la cintura. Típicamente, en la obesidad abdominal, la grasa visceral, también conocida como grasa de órganos o grasa intraabdominal, se encuentra dentro de la cavidad peritoneal, empaquetada entre los órganos internos y el torso, mientras que, en la obesidad general, la grasa subcutánea se encuentra debajo de la piel y la grasa intramuscular se encuentra intercalada en el músculo esquelético.

- [0022]** La obesidad abdominal se determina típicamente solo mirando el cuerpo desnudo, o más específicamente tomando medidas de cintura y cadera. La circunferencia abdominal absoluta (> 102 centímetros (40 pulgadas) en hombres y > 88 centímetros (35 pulgadas) en mujeres) y la relación cintura-cadera (> 0,9 para hombres y > 0,85 para mujeres) se usan como medidas de obesidad abdominal. Preferiblemente, la expresión "adiposidad abdominal" de acuerdo con la invención se refiere a una circunferencia de cintura de más de 102 cm en hombres o de más de 88 cm en mujeres.
- [0023]** Preferiblemente, el sujeto de acuerdo con la invención sufre de esteatosis hepática no alcohólica (enfermedad NAFL) en el momento del muestreo. Más preferiblemente, el sujeto según la invención sufre de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en el momento del muestreo.
- [0024]** "Esteatosis hepática no alcohólica" o "enfermedad NAFL" es un término usado en el presente documento para describir la acumulación de grasa en el hígado de personas que beben poco o nada de alcohol. En muchos casos, la enfermedad NAFL está relacionada con la obesidad. La enfermedad NAFL es común y, para la mayoría de las personas, no causa signos y síntomas ni complicaciones. Pero en algunas personas con enfermedad NAFL, la grasa que se acumula puede causar inflamación y cicatrización en el hígado. Esta forma más grave de la enfermedad NAFL se llama esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- [0025]** En el contexto de la invención, la expresión "esteatohepatitis no alcohólica" o "NASH" se refiere a una enfermedad caracterizada por acumulación de grasa (esteatosis) e inflamación. La esteatosis es el resultado de la acumulación de triglicéridos hepáticos. NASH puede causar daño en el hígado que resultan en fibrosis.
- [0026]** En una realización particular, el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) superior a 37,5 kg/m² y padece al menos dos morbilidades metabólicas seleccionadas del grupo que consiste en diabetes tipo 2, hipertensión y dislipidemia.
- [0027]** Como se usa en el presente documento, "diabetes" o "diabetes mellitus" denota un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del cuerpo no responden apropiadamente a la insulina impidiendo así que las células absorban glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre. Este nivel alto de glucosa en sangre produce los síntomas clásicos de poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed) y polifagia (aumento del hambre). El término "diabetes" incluye diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que causan hiperglucemia.
- [0028]** La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) y diabetes de inicio en adultos, se asocia con resistencia predominante a la insulina y, por lo tanto, deficiencia relativa de insulina y/o un defecto secretor predominante de insulina (o insulinopenia) con resistencia a la insulina. Más específicamente, la diabetes tipo 2 puede asociarse ya sea con (i) una resistencia predominante a la insulina con una insulinopenia moderada o con (ii) una resistencia moderada a la insulina con una insulinopenia predominante.
- [0029]** Como se usa en el presente documento, el término "hipertensión" también denominado "hipertensión arterial", "HTN" o "HPN", denota una afección médica en la que la presión sanguínea está crónicamente elevada. En el contexto de la invención, la hipertensión se define preferiblemente por presión sanguínea sistólica/diastólica de al menos 140/90 mmHg o tomando medicación antihipertensiva.
- [0030]** Como se usa en el presente documento, el término "dislipidemia" indica una elevación de colesterol en plasma, triglicéridos o ambos, o un nivel bajo de lipoproteínas de alta densidad que puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis.
- [0031]** En una realización particular, el sujeto está libre de enfermedad sistémica conocida tal como artritis reumatoide, hipertensión o lupus eritematoso sistémico, enfermedad crónica grave tal como enfermedad cardiovascular o cáncer, y/o ingesta de etanol superior a 20 gramos por día.
- [0032]** En otra realización particular, el sujeto de acuerdo con la invención no mostró síntoma(s) de infección durante el mes que precede al muestreo. De acuerdo con esto, el sujeto de acuerdo con la invención muestra preferiblemente una concentración de proteína reactiva C de referencia en plasma inferior a 10 mg/l y/o no presenta una leucocituria abundante y/o no toma terapia antiviral.

[0033] Como se usa en el presente documento, el término "proteína C reactiva" o "CRP" se refiere a una proteína que es un miembro de la clase de reactivos de fase aguda, ya que sus niveles aumentan dramáticamente durante procesos inflamatorios que ocurren en el cuerpo. Como es conocido por el experto en la técnica, la CRP es típicamente una proteína de 224 residuos con una masa molar de monómero de 25 kDa, codificada por el gen CRP.

5

[0034] Como se usa en este documento, el término "leucocituria" se refiere a la presencia de leucocitos en la orina del sujeto. En particular, una leucocituria abundante corresponde típicamente a la presencia de más de 10 leucocitos/mm³ en la orina.

10 *ADNr bacteriano 16S*

[0035] En el contexto de la invención, las expresiones "ADNr 16S" y "ADN ribosómico 16S" se usan indistintamente y se refieren al gen que codifica el ARN ribosómico 16S constituido por aproximadamente 1500 nucleótidos, que es el componente principal de la subunidad ribosómica procariota pequeña (30S). El ADNr 16S está altamente conservado entre las bacterias. La secuencia del gen de ADNr 16S de *Escherichia coli* de referencia corresponde a SEQ ID NO: 1 (llamada *rrs*). En el contexto de la invención, el ADNr 16S se refiere a cualquier secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1 en otras cepas bacterianas.

15

Muestra biológica

20

[0036] Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" significa una sustancia de origen biológico. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen sangre y componentes de esta tales como suero, plasma, plaquetas, capa leucocitaria (leucocitos), eritrocitos, orina, saliva, agua fecal y tejidos tales como tejidos adiposos, tejidos hepáticos, tejidos pancreáticos y similares. Preferiblemente, una muestra biológica de acuerdo con la presente invención es una muestra de sangre, suero, plasma, leucocito, orina, tejido adiposo o tejido hepático. Más preferiblemente, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, capa leucocítica, suero y muestra de plasma. La muestra biológica de acuerdo con la invención se puede obtener del sujeto por cualquier medio de muestreo adecuado conocido por la persona experta.

25

30 *Procedimiento in vitro para el diagnóstico de la fibrosis hepática*

[0037] La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar la fibrosis hepática en un sujeto que padece obesidad, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

35 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) según el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad.

40 **[0038]** La biopsia hepática es el estándar para diagnosticar la fibrosis hepática y para diagnosticar el trastorno hepático subyacente que causa fibrosis. Sin embargo, la biopsia hepática es invasiva. Por lo tanto, la biopsia hepática no debe realizarse sistemáticamente, sino más bien para confirmar la presencia de fibrosis hepática en un sujeto.

45 **[0039]** Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece obesidad para biopsia hepática, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

50

b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para que se someta a una biopsia hepática.

[0040] Preferiblemente, la concentración de ADNr de 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr de 16S bacteriano con la cantidad de ADN total ("índice de ADNr 16S / ADN total"), se mide mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más preferiblemente mediante PCR cuantitativa (qPCR), más preferiblemente mediante PCR en tiempo real o en tiempo real cuantitativa (RT-PCR o RT-qPCR).

55

[0041] Como se usa en este documento, "PCR en tiempo real", "PCR cuantitativa en tiempo real", "reacción

en cadena de la polimerasa en tiempo real" o "reacción en cadena de la polimerasa cinética" se refiere a una técnica de laboratorio basada en la reacción en cadena de la polimerasa, que es utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN dirigida. Permite tanto la detección como la cuantificación (como número absoluto de copias o cantidad relativa cuando se normaliza la entrada de ADN o genes de normalización adicionales) de una secuencia específica en una muestra. Dos procedimientos comunes de cuantificación son el uso de tintes fluorescentes que se intercalan con el ADN de doble cadena, y las sondas de oligonucleótidos de ADN modificadas que emiten fluorescencia cuando se hibridan con un ADN complementario.

[0042] En el contexto de la invención, la PCR en tiempo real se realiza preferiblemente usando los cebadores universales directo e inverso eubac-F (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' SEQ ID NO: 2) y eubac-R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' SEQ ID NO: 3). Típicamente, la amplificación se realiza usando 2 µl de ADN en un volumen de reacción total de 12,5 µl, usando por ejemplo las tecnologías Sybr Green RT-qPCR, típicamente con el siguiente ciclo: mantener la etapa de 10 minutos a 95 °C, luego 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 63 °C y 1 minuto a 72 °C. Típicamente, la especificidad de la reacción de qPCR se evalúa mediante análisis de una curva de fusión posterior a la PCR, por ejemplo, entre 60 °C y 95 °C.

[0043] Específicamente, los inventores demostraron que la concentración de ADNr 16S bacteriano (por ejemplo, el número de copias por ml de sangre), o la relación ADNr 16S / ADN total (por ejemplo, el número de copias por µg de ADN total), es significativamente más alta en muestras biológicas de sujetos con fibrosis hepática.

[0044] La concentración de ADNr 16S se mide preferiblemente mediante PCR en tiempo real, preferiblemente usando los cebadores universales directo e inverso eubac-F (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' SEQ ID NO: 2) y eubac-R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' SEQ ID NO: 3). Típicamente, la amplificación se realiza usando 2 µl de ADN en un volumen de reacción total de 12,5 µl, usando por ejemplo las tecnologías Sybr Green RT-qPCR, típicamente con el siguiente ciclo: mantener la etapa de 10 minutos a 95 °C, luego 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 63 °C y 1 minuto a 72 °C. Típicamente, la especificidad de la reacción de qPCR se evalúa mediante análisis de una curva de fusión posterior a la PCR, por ejemplo, entre 60 °C y 95 °C.

[0045] En una realización particular, el procedimiento de diagnóstico de fibrosis hepática en un sujeto obeso como se definió anteriormente comprende adicionalmente una etapa a2) de comparación de la concentración de ADNr 16S bacteriano medida, o la relación ADNr 16S / ADN total, con un valor umbral.

[0046] Preferiblemente, cuando se mide la concentración de ADNr 16S bacteriano en la etapa a2), el valor umbral corresponde a una concentración normal de ADNr de 16S bacteriano. También preferiblemente, cuando se mide la relación ADNr 16S / ADN total en la etapa a2), el valor umbral corresponde a una relación normal de ADNr 16S / ADN total.

[0047] Como se pretende en la presente memoria, una "concentración normal" de ADNr 16S bacteriano, respectivamente una "relación normal" de ADNr 16S / ADN total, significa que la concentración de ADNr 16S, respectivamente la relación ADNr 16S / ADN total, en la muestra biológica está dentro de los valores de corte de la norma para ese gen. La norma depende del tipo de muestra biológica y del procedimiento utilizado para medir la concentración de ADNr 16S, respectivamente, la relación ADNr 16S / ADN total, en la muestra biológica. En particular, el valor umbral puede ser la concentración de ADNr 16S bacteriano, respectivamente la relación ADNr 16S / ADN total, que da un valor predictivo negativo y un valor predictivo positivo superior al 80 %, preferiblemente superior al 85 %, más preferiblemente superior a 90 %, incluso más preferiblemente superior a 95 % en la población objetivo.

[0048] Como se usa en el presente documento, el término "población diana" se refiere a una población constituida por sujetos que comparten ciertos parámetros biológicos tales como, por ejemplo, género, grupo de edad o ciertos parámetros ambientales como, por ejemplo, región geográfica.

[0049] Preferiblemente, en los procedimientos de acuerdo con la invención, el valor umbral de las copias de ADNr 16S / µl de recubrimiento leucocítico está entre 460 y 760, aun preferiblemente entre 550 y 720, lo más preferiblemente de 675, siendo dicho valor umbral preferiblemente utilizado cuando la concentración de ADNr 16S bacteriano se mide mediante PCR en tiempo real, preferiblemente utilizando los cebadores universales directo e inverso eubac-F (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', SEQ ID NO: 2) y eubac-R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3', SEQ ID NO: 3). Típicamente, la amplificación se realiza usando 2 µl de ADN en un volumen de reacción total de 12,5 µl, usando por ejemplo las tecnologías Sybr Green RT-qPCR,

típicamente con el siguiente ciclo: mantener la etapa de 10 minutos a 95 °C, luego 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 63 °C y 1 minuto a 72 °C. Típicamente, la especificidad de la reacción de qPCR se evalúa mediante análisis de una curva de fusión posterior a la PCR, por ejemplo, entre 60 °C y 95 °C.

5 **[0050]** Preferiblemente, en los procedimientos de la invención, se determina además si la concentración medida de ADNr 16S bacteriano, o la relación de ADNr de 16S medido / ADN total, se incrementa o disminuye en comparación con el valor umbral de acuerdo con la invención. Todavía más preferiblemente, en los procedimientos de la invención, se determina adicionalmente el nivel de aumento o disminución de la concentración medida de ADNr 16S bacteriano, o de la relación de ADNr 16S medido / ADN total, en comparación con el valor umbral de
10 acuerdo con la invención.

[0051] Como se usa en el presente documento, la expresión "nivel de aumento" significa el porcentaje de aumento de la concentración medida de ADNr de 16S bacteriano, o de la relación ADNr 16S medido / ADN total, en comparación con el valor umbral de acuerdo con la invención o el número de veces de aumento de la concentración
15 medida de ADNr 16S bacteriano, o de la relación ADNr 16S medido / ADN total, en comparación con el valor umbral de acuerdo con la invención.

[0052] Preferiblemente, cuando la concentración o relación medida aumenta en comparación con el valor umbral, su valor es significativamente mayor que el valor umbral.
20

[0053] También preferiblemente, cuando la concentración o relación medida disminuye en comparación con el valor umbral, su valor es significativamente menor que el valor umbral.

[0054] Los inventores demostraron específicamente que el aumento de la concentración de ADNr 16S (por ejemplo, el número de copias por ml de capa leucocitaria) en la muestra biológica de un sujeto en comparación con el valor umbral permitía diagnosticar una fibrosis hepática con una significación muy alta, típicamente con una sensibilidad del 91 % y una especificidad del 73 % o un valor predictivo positivo del 88 % y un valor predictivo negativo del 86 %.
25

[0055] De acuerdo con esto, en los procedimientos para diagnosticar la fibrosis hepática de acuerdo con la invención, una concentración o una relación medida en la etapa a1) que es mayor que el valor umbral es preferiblemente indicativa de la presencia de fibrosis hepática en el sujeto.
30

[0056] También en los procedimientos para diagnosticar la fibrosis hepática de acuerdo con la invención, una concentración o una relación medida en la etapa a1) que es menor que el valor umbral es preferiblemente indicativa de una ausencia de fibrosis hepática en el sujeto.
35

[0057] Preferiblemente, en los procedimientos para seleccionar un sujeto que padece obesidad para biopsia hepática de acuerdo con la invención, el sujeto se selecciona para someterse a biopsia hepática si la concentración o relación medida en el paso a1) es mayor que el valor umbral.
40

[0058] De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto que padece obesidad para un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, comprendiendo dicho procedimiento los pasos de:
45

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para someterse a un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.
50

[0059] Un "régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones" puede ser, por ejemplo, un aumento de la vigilancia del cáncer de hígado, un aumento de la vigilancia de las várices esofágicas o el tratamiento con fármacos.
55

[0060] Como se usa en este documento, "tratamiento farmacológico" o "tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones" pueden referirse, por ejemplo, al tratamiento con un inhibidor de lipasa pancreática, un agonista de PPARgamma, un análogo de leptina, un probiótico o un prebiótico.

[0061] En una realización particular, el procedimiento de diagnóstico de fibrosis hepática en un sujeto obeso como se definió anteriormente, o el procedimiento para seleccionar un sujeto que padece obesidad para un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones como se definió anteriormente, comprende adicionalmente el paso c) de someter al sujeto a un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, si se ha diagnosticado fibrosis hepática en el paso b).

Procedimientos de monitorización

[0062] Los inventores demostraron que la concentración del ADNr 16S bacteriano, o la relación ADNr 16S bacteriano / ADN total, en la muestra biológica de un sujeto que padece fibrosis puede ser útil en el diagnóstico de la fibrosis hepática. Los sujetos que han sido diagnosticados con fibrosis hepática pueden beneficiarse adicionalmente de una monitorización adecuada de la fibrosis hepática o sus complicaciones.

[0063] De acuerdo con esto, otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para controlar a un sujeto obeso que padece fibrosis hepática y/o complicaciones de esta, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto como se define en la sección anterior "Procedimiento in vitro para diagnosticar la fibrosis hepática";

b) según el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar la fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad tal como se define en la sección anterior "Procedimiento in vitro para diagnosticar la fibrosis hepática"; y

c) monitorizar al sujeto para detectar complicaciones de la fibrosis hepática, si se ha diagnosticado fibrosis hepática en el paso b).

[0064] En el contexto de la invención, la expresión "monitorizar a un sujeto por complicaciones de la fibrosis hepática" significa someter a dicho sujeto a atención clínica que incluyen, por ejemplo, ultrasonidos para la detección de cáncer de hígado, o fibroscopía gástrica para la detección de varices en el esófago. Tal cuidado clínico es bien conocido por la persona experta.

Procedimientos de tratamiento

[0065] De acuerdo con otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para tratar a un sujeto que padece obesidad y fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto;

b) según el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar la fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad; y

c) someter el sujeto seleccionado en el paso b) a un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.

[0066] La descripción se refiere además a un procedimiento para tratar a un sujeto que padece obesidad y fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto;

b) basándose en el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para someterse a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones; y

c) administrar al sujeto seleccionado en la etapa b) un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.

[0067] En particular, el tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones es

como se define en la sección "procedimiento in vitro para el diagnóstico de la fibrosis hepática".

[0068] La invención también se refiere al procedimiento in vitro para monitorizar la capacidad de respuesta de un paciente que padece obesidad y de la fibrosis hepática y/o sus complicaciones a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, y que comprende dicho procedimiento los pasos de:

a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto; y

10 b) en función del resultado de la medición en el paso a1), monitorizar la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento farmacológico.

[0069] La expresión "monitorizar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones" puede significar, por ejemplo, adaptar el tratamiento farmacológico. Preferiblemente, "monitorizar la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones" significa cambiar el fármaco utilizado para tratar al paciente, o aumentar o reducir la dosis, la frecuencia de administración o cambiar la vía de administración del tratamiento farmacológico.

20 *Procedimientos de selección*

[0070] La presente invención también se refiere a un procedimiento para seleccionar un probiótico, un prebiótico, un compuesto químico o un compuesto biológico adecuado para prevenir y/o tratar la fibrosis hepática, que comprende las etapas de:

25

- medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica de un sujeto obeso que padece fibrosis hepática que ha sido tratado con el probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato; y

30 - comparar dicha concentración, o dicha relación, con la de un sujeto obeso de control que padece fibrosis hepática que no ha sido tratado con dicho probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato;

donde una concentración más alta, o una relación más alta, medida en la muestra biológica del sujeto de control que en la muestra biológica del sujeto tratado con el probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato, indica que dicho probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato es adecuado para evitar y/o tratar la fibrosis hepática.

35

[0071] Como se usa en el presente documento, el término "probióticos" indica suplementos dietéticos y microorganismos vivos que contienen bacterias o levaduras potencialmente beneficiosas. De acuerdo con la definición adoptada actualmente por la FAO/OMS, los probióticos corresponden a microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Los ejemplos de probióticos de acuerdo con la invención incluyen cepas bacterianas de los géneros bifidobacterium, lactobacillus, bacteroides o de la clase fusobacteria.

40

[0072] Como se usa en este documento, el término "prebióticos" describe un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente como sustrato el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el intestino, en particular en el colon, y por lo tanto mejora la salud del huésped.

45

[0073] En el contexto de la invención, los "prebióticos" incluyen prebióticos aislados o purificados, así como prebióticos naturales presentes en los suplementos dietéticos.

50

[0074] En el contexto de la invención, los "probióticos" abarcan probióticos aislados o purificados, así como prebióticos naturales presentes en suplementos dietéticos.

55

[0075] Como se usa en este documento, el término "compuesto químico o biológico" abarca compuestos químicamente sintetizados y compuestos de origen biológico que tienen un efecto sobre el crecimiento, el metabolismo, la supervivencia de bacterias y/o su paso a través de la barrera intestinal. En particular, los compuestos químicos o biológicos de acuerdo con la invención incluyen moléculas que modifican la flora bacteriana

del tracto digestivo y/o que modifican la migración de bacterias a través del tracto digestivo y/o que modifican la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal. Los ejemplos de compuestos químicos o biológicos de la invención incluyen bactericidas, antibióticos, así como compuestos que actúan sobre uniones estrechas intercelulares epiteliales, microvellosidades, recubrimiento celular y/o células epiteliales intestinales.

5

[0076] El sujeto de control que no se ha tratado puede ser un sujeto no relacionado con el sujeto que recibe el compuesto prebiótico, probiótico o químico o biológico candidato, o el mismo sujeto antes del tratamiento con el compuesto prebiótico, probiótico o químico o biológico candidato.

10 **[0077]** La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0078]

15

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia del gen ADNr 16S de Escherichia coli de referencia.

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia del cebador directo de ADNr universal eubac-F.

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia del cebador inverso de ADNr universal eubac-R.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[0079]

25 **La Figura 1** muestra la distribución del nivel de ADN bacteriano 16S en la sangre de 37 pacientes, medida mediante un ensayo qPCR de ADNr 16S.

La Figura 2 muestra la concentración de ADNr 16S bacteriano en sangre en pacientes con fibrosis o sin ella, medida mediante un ensayo de qPCR de ADNr 16S.

30 **La Figura 3** muestra la concentración de ADNr 16S bacteriano en sangre en pacientes sin fibrosis o con fibrosis en diversas etapas, tal como se mide mediante un ensayo qPCR de ADNr 16S.

La Figura 4 muestra la curva ROC para el diagnóstico de fibrosis hepática.

35 **EJEMPLO 1**

Materiales y procedimientos

Población

40

[0080] Se llevó a cabo un estudio transversal en la cohorte de Florinash (<http://www.florinash.org/>). Los pacientes incluidos tenían obesidad severa (IMC>40 o IMC>37,5 más dos comorbilidades metabólicas como diabetes tipo 2, hipertensión y dislipidemia, según ATPIII) y se habían orientado a la cirugía de derivación gástrica, una vez que las intervenciones de estilo de vida apropiadas habían fracasado, para reducir el peso corporal y reducir el riesgo cardiovascular. Los criterios de exclusión fueron enfermedad sistémica, infección en el mes anterior, enfermedad crónica grave, >20 g de ingesta de etanol por día. Se analizaron todos los pacientes para los que se dispuso de muestras de fracciones de recubrimiento leucocitario.

Determinación de la concentración del gen de ADNr 16S en sangre

50

[0081] Se extrajo ADN total de 100 µl de fracción de recubrimiento leucocitario usando un kit de tecnología de membrana de sílice. La concentración total de ADN se determinó usando el espectrómetro UV Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El contenido de ADN bacteriano (ADNr 16S) se cuantificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7, Life Technology) usando placas de pocillos de grado óptico 384. La reacción de qPCR se realizó usando los cebadores directos e inversos de ADNr universales eubac-F (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', SEQ ID N°: 2) y eubac-R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3', SEQ ID N°: 3). La etapa de amplificación fue seguida por una etapa de curva de fusión para determinar la especificidad del producto de amplificación obtenido. La cantidad de ADN amplificado (ADNr 16S) se expresó como datos brutos de 2^{-ct} o normalizados con una escala estándar basada en plásmido de ADNr 16S de E. Coli. El coeficiente de variación

55

(repetibilidad) del procedimiento (0,24 %) se determinó usando 30 mediciones repetidas.

Análisis estadístico

- 5 **[0082]** Se muestran las características de los participantes que sí o no tenían fibrosis y las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y las pruebas exactas de Fisher se realizaron en variables cuantitativas y categóricas, respectivamente. Además, se presenta la curva ROC para el diagnóstico de la fibrosis hepática.

Resultados

10

[0083] Se realizó un ensayo de qPCR de ADNr 16S bacteriano con muestras de sangre de los 37 pacientes. Este ensayo reveló, como se muestra en la distribución de la Figura 1, que dos poblaciones diferentes coexisten en la cohorte: una con un nivel bajo y una con un nivel alto de ADN bacteriano 16S en la sangre que se correlaciona con el estado de fibrosis hepática. El análisis de la correlación entre el estado de fibrosis de los pacientes y la concentración de ADNr 16S bacteriano en sangre mostró un aumento muy significativo del ADNr 16S bacteriano en sangre con fibrosis (Figura 2), que se correlaciona notablemente con el estadio de la enfermedad (Figura 3). Este resultado demuestra que la fibrosis hepática está asociada en la cohorte a un cambio claro en la cantidad de ADN 16S bacteriano en la sangre que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

15

- 20 **[0084]** Como se muestra en la Figura 4, el área bajo la curva ROC para el diagnóstico de fibrosis hepática es 0,87.

[0085] Las características de la población se presentan en la Tabla 1. La concentración de ADNr 16S (copias/ μ l) fue significativamente mayor en pacientes con fibrosis hepática (Tabla 1). La distribución de la concentración de ADNr 16S se desplazó hacia valores más altos en pacientes con fibrosis hepática. En un umbral de 675 copias de ANDr 16S / ml de capa leucocítica, el valor predictivo negativo es del 86 %, el valor predictivo positivo es del 88 %, la sensibilidad del examen es del 55 % y la especificidad es del 96 %. En un umbral de 281 copias de ADNr 16S / ml de capa leucocítica, el valor predictivo negativo es del 95 %, el valor predictivo positivo es del 56 %, la sensibilidad de la prueba es del 91 % y la especificidad es del 73 %.

30

[0086] En conclusión, los resultados demuestran que la determinación de la concentración del gen de ADNr 16S en sangre permite diagnosticar o descartar la fibrosis hepática en pacientes obesos.

Tabla 1: Características de la población estudiada

	Controles (sin fibrosis)		Casos (fibrosis)		Casos frente a controles
Total (n)	26		11		
Variables categóricas	n	%	n	%	p (Fisher)
Hombres	5		2		1,00
Mujeres	21		9		1,00
Situación en cuanto al tabaco*					
Nunca han fumado	12	48,0	6	54,5	1,00
Era fumador/a	7	28,0	3	27,3	
Fuma actualmente	6	24,0	2	18,2	
Hipertensión tratada	11	42,3	6	54,5	0,72
Diabetes tratada	6	23,1	5	45,5	0,24
Dislipidemia tratada	6	23,1	2	18,2	1,00
Variables cuantitativas	Media	DE	Media	DE	p (Mann-Whitney)
Edad (años)	46,2	8,9	48,1	9,3	0,56
Índice de masa corporal (kg/m²)	44,7	6,7	41,9	6,5	0,17
Colesterol total (mg/dl)	193,5	34,2	188,5	28,1	0,66
Colesterol HDL (mg/dl)	47,5	10,5	44,2	5,5	0,27
GPT (U/l)	25,2	19,29	24,36	6,454	0,17
GGT(U/l)	20,5	9,4	23,9	7,2	0,1
Glucosa (mg/dl)	99,6	29,2	112,5	37,4	0,39
Proteína C reactiva (mg/dl)*	0,73	0,44	0,78	0,75	0,57
Hematocrito (%)	40,5	4,6	38,6	4,0	0,33
Leucocitos (103/μl)	7,3	2,0	7,8	2,0	0,55
Neutrófilos (103/μl)	4,6	1,9	4,9	1,9	0,64
AND 16S en sangre (copias/μl)	239,3	186,4	652,6	285,4	0,0002

GPT: glutamato-piruvato transaminasa, GGT: gamma-glutamil transpeptidasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

*Faltan datos de un paciente

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0087]

<110> VAOMER
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA

FUNDACIO INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE GIRONA DR.
JOSEP TRUETA

<120> PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS HEPÁTICA

5

<130> BET 15P1059

<150> EP 14305597.8

<151> 2014-04-23

10

<160> 3

<170> Patente en la versión 3.5

15 <210> 1

<211> 1542

<212> DNA

<213> Escherichia coli

20 <400> 1

ES 2 684 758 T3

aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa 60
 gtcgaacggt aacaggaagc agcttgctgc tttgctgacg agtggcggac gggtgagtaa 120
 tgtctgggaa actgcccgat ggagggggat aactactgga aacggtagct aataccgcat 180
 aacgtcgcaa gaccaaagag ggggaccttc gggcctcttg ccatcggatg tgcccagatg 240
 ggattagcta gtaggtgggg taacggctca cctaggcgac gatccctagc tggtctgaga 300
 ggatgaccag ccacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg 360
 ggaatattgc acaatgggcg caagcctgat gcagccatgc cgcgtgtatg aagaaggcct 420
 tcgggttgta aagtactttc agcggggagg aagggagtaa agttaatacc tttgctcatt 480
 gacgttaccg gcagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg taatacggag 540
 ggtgcaagcg ttaatcgaa ttactgggcg taaagcgac gcaggcggtt tgттаagtca 600
 gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa ctgcatctga tactggcaag cttgagtctc 660
 gtagaggggg gtagaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc 720
 ggtggcgaag gcggccccct ggacgaagac tgacgctcag gtgcgaaagc gtggggagca 780
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcgacttgg aggttgtgcc 840
 cttgaggcgt ggcttccgga gctaacgcgt taagtgcacc gcctggggag tacggccgca 900
 aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 960
 tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctggtc ttgacatcca cggaagtttt cagagatgag 1020
 aatgtgcctt cgggagccgt gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgttgtga 1080
 aatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttatcc tttgttgcca gcggtccggc 1140
 cgggaactca aaggagactg ccagtgataa actggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc 1200

 atcatggccc ttacgaccag ggctacacac gtgctacaat ggcgcataca aagagaagcg 1260
 acctcgcgag agcaagcggg cctcataaag tgcgtcgtag tccggattgg agtctgcaac 1320
 tcgactccat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtggatca gaatgccacg gtgaatacgt 1380
 tccccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgcaaa agaagtaggt 1440
 agcttaacct tcgggagggc gcttaccact ttgtgattca tgactgggggt gaagtcgtaa 1500
 caaggtaacc gtaggggaac ctgcggttgg atcacctcct ta 1542

<210> 2

ES 2 684 758 T3

<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Primer

<400> 2
tcctacggga ggcagcagt 19

10 <210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Primer

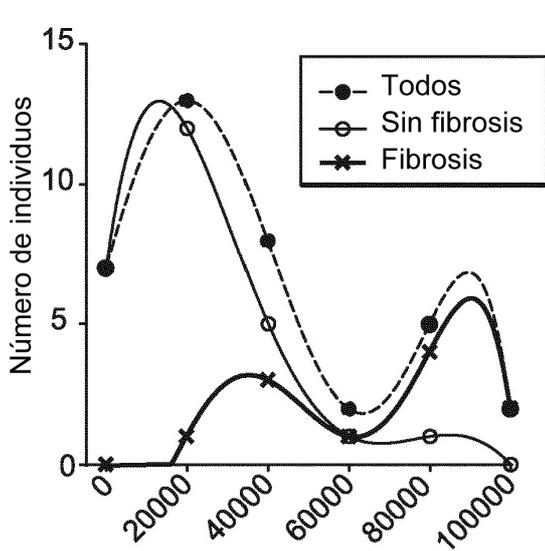
<400> 3
20 ggactaccag ggtatcta cctggt 26

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para diagnosticar la fibrosis hepática en un sujeto que padece obesidad, y dicho procedimiento comprende los pasos de:
- 5 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto seleccionado del grupo que consiste en sangre, suero y muestra de plasma; y
- 10 b) según el resultado de la medición en el paso a1), diagnosticar fibrosis hepática en el sujeto que padece obesidad.
2. Un procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto que padece obesidad para la biopsia hepática, y dicho procedimiento comprende los pasos de:
- 15 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto seleccionado del grupo que consiste en sangre, suero y muestra de plasma; y
- 20 b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para que se someta a una biopsia hepática.
3. Un procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto que padece obesidad para un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, dicho procedimiento comprende los pasos de:
- 25 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto seleccionado del grupo que consiste en sangre, suero y muestra de plasma; y
- 30 b) según el resultado de la medición en el paso a1), seleccionar al sujeto que padece obesidad para someterse a un régimen de tratamiento dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones.
4. Un procedimiento in vitro para controlar la capacidad de respuesta de un paciente que padece obesidad y de la fibrosis hepática y/o sus complicaciones a un tratamiento farmacológico dirigido a la fibrosis hepática y/o sus complicaciones, comprendiendo dicho procedimiento los pasos de:
- 35 a1) medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica del sujeto seleccionado del grupo que consiste en sangre, suero y muestra de plasma; y
- 40 b) según el resultado de la medición en el paso a1), monitorizar la capacidad de respuesta del paciente a dicho tratamiento farmacológico.
5. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un paso a2) de comparación de la concentración o la relación medida en el paso a1) con un valor umbral.
- 45 6. El procedimiento in vitro para diagnosticar la fibrosis hepática según la reivindicación 5, en el que una concentración o una relación medida en la etapa a1) que es mayor que el valor umbral es indicativa de fibrosis hepática en el sujeto.
- 50 7. El procedimiento in vitro para diagnosticar la fibrosis hepática según la reivindicación 5, en el que una concentración o una relación medida en la etapa a1) que es inferior al valor umbral es indicativa de una ausencia de fibrosis hepática en el sujeto.
8. El procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto para biopsia hepática de acuerdo con la reivindicación 5, o el procedimiento in vitro para seleccionar un sujeto para régimen de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el sujeto que padece obesidad se selecciona si la concentración o una relación medida en el paso a1) es mayor que el valor de umbral.
9. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la

concentración o las cantidades medidas en el paso a1) se miden por PCR en tiempo real.

- 5 10. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sujeto sufre de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFL) en el momento del muestreo.
11. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto sufre de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en el momento del muestreo.
- 10 12. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) superior a 37,5 kg/m² y sufre de al menos dos comorbilidades metabólicas seleccionadas del grupo que consiste en diabetes tipo 2, hipertensión y dislipidemia.
- 15 13. El procedimiento in vitro de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) superior a 40 kg/m².
14. Un procedimiento para seleccionar un probiótico, un prebiótico, un compuesto químico o un compuesto biológico adecuado para prevenir y/o tratar la fibrosis hepática, que comprende los pasos de:
- 20 - medir la concentración de ADNr 16S bacteriano, o la relación de la cantidad de ADNr 16S bacteriano con la cantidad de ADN total, en una muestra biológica de un sujeto obeso que padece fibrosis hepática que ha sido tratado con el candidato probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico; y
- 25 - comparar dicha concentración, o dicha relación, con la de un sujeto obeso de control que padece fibrosis hepática que no ha sido tratado con dicho candidato probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico;
- 30 donde una concentración más alta, o una relación más alta, medida en la muestra biológica del sujeto de control que en la muestra biológica del sujeto tratado con el probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico candidato, indica que dicho candidato probiótico, prebiótico, compuesto químico o compuesto biológico es adecuado para prevenir y/o tratar la fibrosis hepática,
- y en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero y muestra de plasma.



Distribución de copias/100 µl de 16S en capa leucocitaria

FIG.1

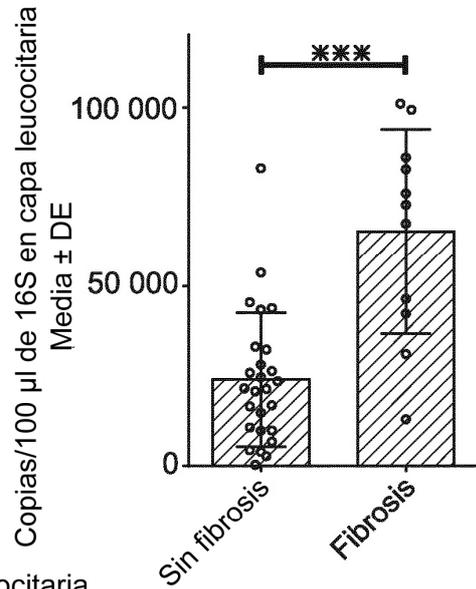


FIG.2

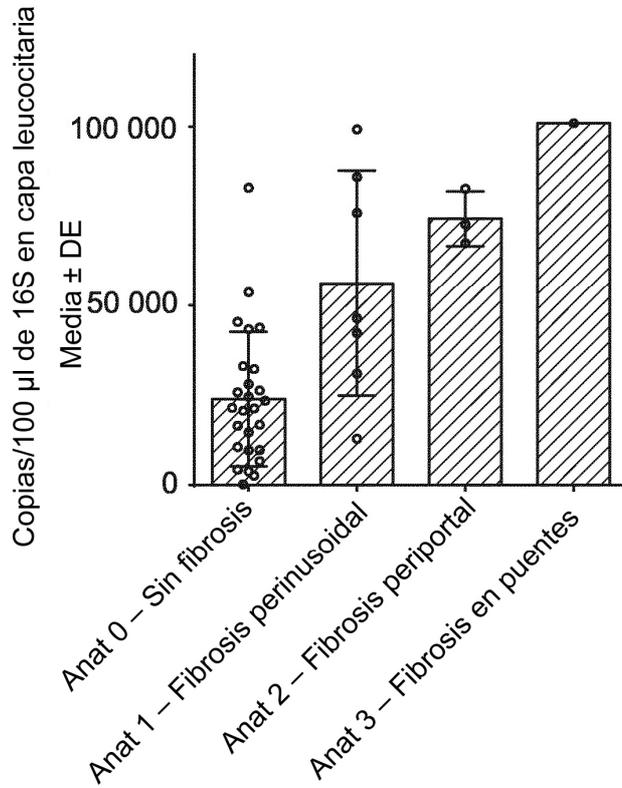


FIG.3

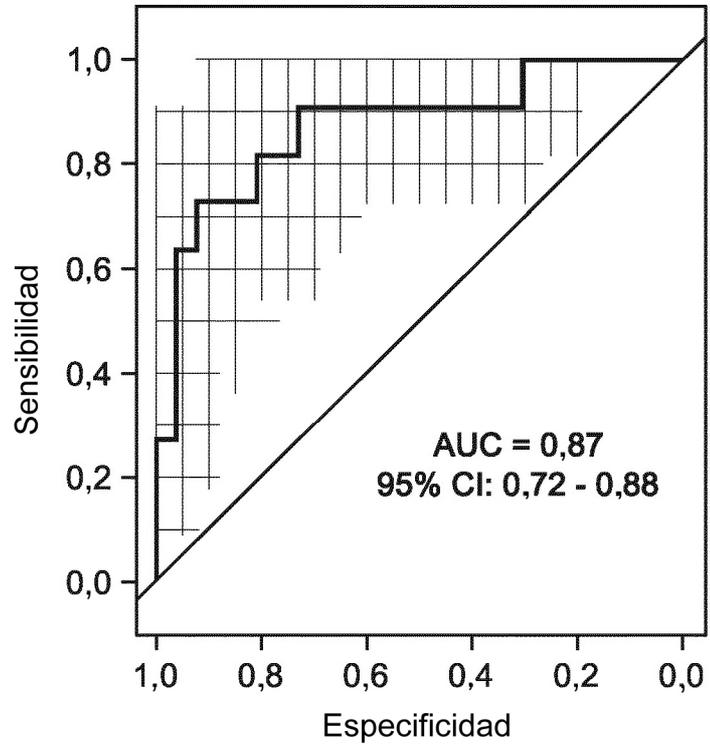


FIG.4