

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 351**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/487** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2014 PCT/JP2014/070426**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2014 E 14834659 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3032256**

54 Título: **Método para la investigación del tipo de daño hepático**

30 Prioridad:

**05.08.2013 JP 2013162429**

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

**22.03.2019**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)  
3-5-1, Nihonbashi-Honcho Chuo-ku  
Tokyo 103-0023, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUURA, TOMOKAZU;  
AMANO, KATSUSHI;  
SUGITA, TOMONORI;  
MASUBUCHI, NORIKO y  
SUGIHARA, MASAHIRO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 705 351 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la investigación del tipo de daño hepático

## 5 Campo Técnico

La presente invención se refiere a un método de prueba para la lesión hepática, y más en particular, a un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática. Más en particular, la presente invención se refiere a un método de prueba que comprende medir un nivel de ácido litocólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como LCA) en una muestra biológica recolectada de un sujeto, y discriminar un tipo de lesión hepática mediante el uso del nivel medido de LCA como un indicador como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## Antecedentes

15 El hígado es un tejido glandular conectado al tracto digestivo y tiene diversas funciones importantes para los organismos vivos, tales como la producción y secreción de la bilis, una acción de desintoxicación, el metabolismo de los carbohidratos, el metabolismo de las proteínas, la producción de un factor de coagulación de la sangre, una acción de regulación hormonal, y el almacenamiento de diversos componentes de organismos vivos, incluidos grasa, glucógeno, una proteína y una vitamina. Por lo tanto, cuando esas funciones se dañan de forma aguda o crónica debido a una infección viral, a un fármaco o un agente tóxico, o a la ingesta en exceso de alcohol, se altera el mantenimiento de la homeostasis de las funciones hepáticas, lo que da como resultado un problema de salud crítico. Entre las diversas enfermedades encontradas en el examen médico exhaustivo o similar, la disfunción hepática representa una alta proporción de las enfermedades, y se estima que aproximadamente el 30 % de los adultos japoneses tienen disfunción hepática.

25 Las enfermedades incluidas en los trastornos hepáticos se clasifican en base a sus etiologías o síntomas clínicos. Por ejemplo, las enfermedades pueden clasificarse en base a sus etiologías en hepatitis viral, lesión hepática inducida por fármacos, lesión hepática alcohólica, lesión hepática autoinmunitaria, lesión hepática metabólica, y similares. Además, las enfermedades pueden clasificarse en base a sus síntomas clínicos en de tipo lesión hepatocelular y de tipo colestasis. La lesión hepatocelular se encuentra en hepatitis viral, lesión hepática tóxica, hígado graso, cirrosis, y similares. La lesión hepatocelular es provocada, por ejemplo, por necrosis, metamorfosis grasa, multinucleación, o degeneración vacuolar nuclear de un hepatocito. El hepatocito, que también se denomina célula del parénquima hepático, es una de las células que constituyen el hígado y representa las partes más importantes del hígado. El hepatocito es una célula exocrina que secreta la bilis, mientras que también es una célula endocrina que secreta proteínas plasmáticas en un lado de la membrana apical y almacena glucógeno para regular la glucosa en sangre. Por lo tanto, cuando se daña el hepatocito, se provoca una reducción significativa de la función hepática. La colestasis es provocada por el bloqueo de la excreción de bilis desde el hígado debido a algunas causas, con el resultado de que la excreción anormal de la bilis se produce sobre una parte o todo el sistema de conductos biliares intrahepáticos o extrahepáticos, y de este modo la bilis se acumula en el hígado y la sangre. Después, se inducen diversos síntomas tales como ictericia y hepatitis.

40 En el presente, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades hepáticas se realizan de acuerdo con un enfoque en el cual un médico diagnostica empíricamente un tipo de lesión hepática mediante el uso de un síntoma de un paciente y los valores de los parámetros bioquímicos séricos como indicadores y después se inicia el tratamiento (Literatura distinta de la de patentes 1). Las enzimas que se escapan del hepatocito por la lesión hepatocelular se usan como los parámetros bioquímicos. Específicamente, se usan, por ejemplo, la aspartato aminotransferasa (de aquí en adelante abreviada como AST; algunas veces denominada glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT)), la alanina aminotransferasa (de aquí en adelante abreviada como ALT; algunas veces denominada glutamato-piruvato transaminasa (GPT)), la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (de aquí en adelante abreviada como  $\gamma$ -GTP), y la fosfatasa alcalina (de aquí en adelante abreviada como ALP).

50 Además, en las prácticas no clínicas y clínicas, generalmente se realiza la medición de los ácidos biliares totales (de aquí en adelante abreviados como TBA). Los ácidos biliares es un término general para compuestos que son derivados esteroideos que tienen esqueletos de ácido colánico ampliamente encontrados en la bilis de mamíferos y son los componentes principales de la bilis que juega un papel importante en la digestión y absorción de la grasa. Los ácidos biliares se producen a partir del metabolismo del colesterol en hepatocitos del hígado (Figura 1), seguido de la conjugación con glicina y taurina (ácido aminoetilsulfónico) o similares, y después se excretan como bilis. Los ácidos biliares se clasifican aproximadamente en ácidos biliares primarios y ácidos biliares secundarios. Los ácidos biliares primarios son ácidos biliares que se sintetizan en el hígado. Los ejemplos de los ácidos biliares primarios pueden incluir ácido cólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como CA), ácido quenodesoxicólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como CDCA), y ácido ursodesoxicólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como UDCA) el cual tiene una relación isomérica con CDCA. Los ácidos biliares secundarios son ácidos biliares que se producen a partir de los ácidos biliares primarios excretados a través del conducto biliar al tracto intestinal en una reacción de deshdroxilación, una reacción de deshdrogenación, una reacción de hidrogenación, o una reacción de desconjugación por enterobacterias. Los ejemplos de los ácidos biliares secundarios pueden incluir ácido desoxicólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como DCA) y LCA. Esos cinco tipos de componentes del ácido biliar dados como ejemplos tienen cada uno tres formas que son una forma libre, una forma conjugada a glicina, y una forma conjugada a taurina. Además, algunos componentes del ácido biliar tienen cada uno una forma sulfatada o una forma glucuronidada. En muchas especies

animales incluidas los seres humanos, CA y CDCA que tienen grupos hidroxilo en la posición 3, 7, y 12 de un esqueleto de ácido colánico se producen como los ácidos biliares primarios. Mientras tanto, algunos animales producen ácidos biliares inherentes a la especie. Por ejemplo, el ácido  $\alpha$ -muricólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como  $\alpha$ MCA) y el ácido  $\beta$ -muricólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como  $\beta$ MCA) se encuentran en ratones y el ácido hiocólico (de aquí en adelante abreviado algunas veces como HCA) se encuentra en cerdo, y estos ácidos biliares son raros en seres humanos y son característicos de cada una de las especies animales.  $\alpha$ MCA y  $\beta$ MCA son ácidos biliares primarios y también se conocen las formas conjugadas a taurina de estos. HCA es un ácido biliar primario y produce ácido hiodesoxicólico (de aquí en adelante abreviado como HDCA) mediante su 7 $\alpha$ -deshidroxilación en intestino. Esos componentes del ácido biliar también tienen formas conjugadas a glicina y formas conjugadas a taurina.

En el tratamiento de enfermedades hepáticas, la discriminación de un tipo de lesión hepática es importante para la selección del tratamiento adecuado para cada tipo de lesión hepática. Hasta ahora, los tipos de lesiones hepáticas se han determinado en base a parámetros bioquímicos. Por ejemplo, un tipo de lesión hepática se determina mediante el uso, como indicadores, los aumentos de ALT y AST en el tipo lesión hepatocelular y los aumentos de ALP y  $\gamma$ -GTP en el tipo colestasis. Sin embargo, un método de determinación en base a parámetros bioquímicos algunas veces conduce a un juicio erróneo de un tipo de lesión hepática. Por lo tanto, se ha intentado medir los niveles de muchos componentes que constituyen los ácidos biliares en suero y discriminar un tipo de lesión hepática en base a los resultados para determinar además una estrategia terapéutica.

Existen informes anteriores sobre diversas relaciones entre la clasificación de los tipos de lesiones hepáticas en base a las etiologías y los niveles de los componentes del ácido biliar (Literaturas distintas de las de patentes 2 a 6). Sin embargo, no se ha alcanzado un consenso y no se ha logrado una aplicación clínica.

Además, existen algunos informes sobre la asociación entre la clasificación de los tipos de lesiones hepáticas en base a los síntomas y los niveles clínicos de los componentes del ácido biliar (Literaturas distintas de las de patentes 6 a 8). Sin embargo, de manera similar a la clasificación de los tipos de lesiones hepáticas en base a las etiologías, se han mostrado una variedad de resultados y no se ha alcanzado un consenso. Mientras tanto, para la clasificación de los tipos de lesión hepática inducida por fármacos en base a los síntomas clínicos, se ha propuesto un método de evaluación que usa parámetros bioquímicos en lugar de los componentes del ácido biliar (Literatura distinta de la de patentes 9). En base a esta propuesta, la Sociedad Japonesa de Hepatología propuso una puntuación para la lesión hepática inducida por fármacos (Literatura distinta de la de patentes 10). Además, los inventores de la presente invención han informado que una enfermedad hepática provocada por la administración de un fármaco a una rata se comparó con un modelo de colestasis típico obtenido mediante la ligadura del conducto biliar, o la administración de 1-naftil isotiocianato (ANIT), o similares, y que los tipos de lesión de las enfermedades hepáticas pueden discriminarse mediante la medición de los niveles de los componentes del ácido biliar (Literatura distinta de la de patentes 11). Literatura distinta de la de patentes 13 se refiere al examen clínico de los ácidos biliares séricos para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares. Sin embargo, en el presente, no existe un informe sobre un biomarcador definitivo que diagnostique clínicamente una etapa temprana de colestasis en hígado a nivel de conducto biliar capilar. Por lo tanto, la decisión de una estrategia terapéutica es difícil en muchos casos.

Lista de citas

Literatura distinta de la de patentes

- [NPL 1] Manual for handling disorders due to adverse drug reactions, Drug-induced liver injury: 10-30 (abril de 2008, Ministry of Health, Labour and Welfare)
- [NPL 2] IA Bouchier, CR Pennington, Serum bile acids in hepatobiliary disease. *Gut*. Jun;19(6):492-6 (1978).
- [NPL 3] Fischer, S, Beuers, U, Spengler, U, Zwiebel, FM, Koebe, H-G, Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clinica Chimica Acta*. 251(2):173-86 (1993).
- [NPL 4] Williams CN, Bile-acid metabolism and the liver. *Clin Biochem*. 9(3):149-52 (1976).
- [NPL 5] Berr F, Pratschke E, Fischer S, Paumgartner G. Disorders of bile acid metabolism in cholesterol gallstone disease. *J Clin Invest*. 90(3):859-68 (1992).
- [NPL 6] Ostrow JD, Metabolism of bile salts in cholestasis in humans. En: Tavoloni, N, Berk, PD (Eds), *Hepatic transport and bile secretion*. Raven, Nueva York, págs.673-712 (1993).
- [NPL 7] Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM, Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 826 (1-2):147-59 (2005).
- [NPL 8] Palmeira CM, Rolo AP, Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology*. 203(1-3):1-15(2004).
- [NPL 9] Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol*. 46(11):1323-30 (1993).
- [NPL 10] Hajime Takigawa, Proposal of diagnostic criteria of drug induced hepatic injury in DDW-J2004 workshop, *Kanzo*, 46(2):85-90 (2005)
- [NPL 11] Noriko Masubuchi y otros, 24th Annual Meeting of The Japanese Society for the Study of Xenobiotics, pág. 305, 2-P-43, 2009.
- [NPL 12] A. Stiehl, Bile Salt Sulphates in Cholestasis. *European Journal of Clinical Investigation*. 4 (1):59-63 (1974).

[NPL 13] K. Fujiwara, Clinical Examination of Serum Bile Acids for the Diagnosis of Hepatobiliary Diseases. Jpn J Clin Pathol. 37:1114~1121, 1989.

Resumen de la invención

5

Problema técnico a resolver por la invención

10

Las lesiones hepáticas pueden clasificarse en de tipo lesión hepatocelular y de tipo colestasis en base a los síntomas clínicos. No existe una técnica establecida capaz de determinar esos tipos, aunque la discriminación de los tipos es importante para la selección del tratamiento adecuado para cada uno de los tipos. Por lo tanto, el tratamiento tal como la medicación se realiza actualmente de acuerdo con una decisión integral de los médicos en base a sus experiencias clínicas durante el tratamiento común. Hasta ahora, en el caso de la determinación de un tipo de lesión hepática en base a un parámetro bioquímico, el aumento de ALT y AST se ha usado como un indicador del tipo lesión hepatocelular, mientras que el aumento de ALP y  $\gamma$ -GTP se ha usado como un indicador del tipo colestasis. Sin embargo, en algunos casos la determinación en base a solo esos indicadores conduce a un juicio erróneo. En consecuencia, un marcador capaz de discriminar más definitivamente un tipo de lesión hepática en la etapa inicial de la aparición de la enfermedad hepática permite la determinación temprana de una estrategia terapéutica.

15

20

Un objetivo de la presente invención es encontrar un biomarcador útil que permita el diagnóstico temprano de un tipo de lesión hepática, y proporcionar un método para discriminar un tipo de lesión hepática o un método para ayudar a la discriminación de un tipo de lesión hepática, en ambos de los cuales se usa el biomarcador como un indicador.

Solución al Problema

25

Los inventores de la presente invención han hecho intensas investigaciones para lograr el objetivo, y encontrar la asociación de un nivel de ácido litocólico con un tipo de lesión hepática midiendo los niveles de 24 tipos de componentes del ácido biliar, un marcador de fibrosis hepática, y un marcador de estrés oxidativo en muestras de suero clínicas y sometiendo los datos obtenidos por la medición a análisis multivariable. Específicamente, el nivel de ácido litocólico mostró una tendencia a ser alto en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular en una población de pacientes con lesión hepática, y por el contrario, el nivel mostró una tendencia a ser bajo en la lesión hepática de tipo colestasis. Además, se encuentra que en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, un nivel de ácido ursodesoxicólico mostró una tendencia a ser bajo y un nivel de colágeno tipo IV, que era un marcador de fibrosis hepática, mostró una tendencia a ser alto. Mientras tanto, en la lesión hepática de tipo colestasis, un nivel de ácido desoxicólico mostró una tendencia a ser bajo, y los niveles de ácido biliar sulfatado sérico (de aquí en adelante abreviado como SSBA), colágeno tipo IV y ácido hialurónico (de aquí en adelante abreviado como HA), que eran marcadores de fibrosis hepática, y de especies reactivas de oxígeno (de aquí en adelante abreviadas como ROS), que era un marcador de estrés oxidativo, mostraron una tendencia a ser altos. Además, los niveles de conjugados de taurina y de conjugados de glicina de diversos ácidos biliares mostraron similares tendencias a los niveles de los componentes en una forma libre. Por lo tanto, los inventores de la presente invención han revelado que un tipo de lesión hepática puede discriminarse mediante el uso de un biomarcador incluidos los componentes del ácido biliar que muestran tendencias características en dependencia de los tipos de lesión hepática, y lograron la presente invención.

30

35

40

Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente.

45

1. Un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, que comprende medir un nivel de LCA en una muestra biológica recolectada de un sujeto para usar el nivel de LCA como un indicador, el método de prueba que comprende además determinar el tipo de lesión hepática como del tipo lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular o

50

determinar el tipo de lesión hepática como del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis o determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.

55

2. El método de prueba de acuerdo con el punto 1. mencionado anteriormente, que comprende, además:

medir uno o ambos niveles de UDCA y de colágeno tipo IV, para usar como indicadores el uno o ambos niveles de UDCA y de colágeno tipo IV además del nivel de LCA; y

60

determinar el tipo de lesión hepática como de tipo lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV satisface cualquiera de los siguientes:

(1) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular;

65

(2) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular; y

(3) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular.

5 3. El método de prueba de acuerdo con el punto 1. mencionado anteriormente, que comprende, además:

medir uno o más de los niveles de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS, para usar como indicadores los niveles de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS además del nivel de LCA; y  
10 determinar el tipo de lesión hepática como del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y los niveles medidos de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS satisfacen cualquiera o dos o más de los siguientes:

(4) el nivel de DCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;

15 (5) el nivel de SSBA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;

(6) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;

20 (7) el nivel de HA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis; y

(8) el nivel de ROS es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.

4. El método de prueba de acuerdo con el punto 1. mencionado anteriormente, que comprende, además:

25 medir un nivel de colágeno tipo IV, para usar como un indicador el nivel de colágeno tipo IV además del nivel de LCA; y determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y de tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y cuando el nivel medido de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.

30 5. El método de prueba de acuerdo con los puntos 1., 2., 3., 4. mencionados anteriormente, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA se calcula a partir de una curva de la característica operativa del receptor, la cual de aquí en adelante se denomina curva ROC, del nivel de LCA.

6. El método de prueba de acuerdo con el punto 1., 2., o 4. mencionado anteriormente, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular se calcula a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular.

40 7. El método de prueba de acuerdo con el punto 1., 2., o 4. mencionado anteriormente, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis se calcula a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo colestasis.

45 8. El método de prueba de acuerdo con el punto 2. mencionado anteriormente, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, y el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular se calculan a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, una curva ROC predeterminada del nivel de UDCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, y una curva ROC predeterminada del nivel de colágeno tipo IV para la enfermedad hepática de tipo lesión hepatocelular, respectivamente.

50 9. El método de prueba de acuerdo con el punto 3. mencionado anteriormente, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, y el valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión hepática de tipo colestasis se calculan a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de DCA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de SSBA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de colágeno tipo IV para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de HA para lesión hepática de tipo colestasis, y una curva ROC predeterminada del nivel de ROS para lesión hepática de tipo colestasis, respectivamente.

65 10. El método de prueba de acuerdo con cualquiera de los puntos 1. a 9. mencionados anteriormente, en el cual la muestra biológica es una muestra sanguínea.

11. El método de prueba de acuerdo con cualquiera de los puntos 1. a 10. mencionados anteriormente, en el cual la muestra biológica es una muestra sérica.

5 12. Un método de selección de un agente terapéutico para lesión hepática de acuerdo con un tipo de lesión hepática, en donde el método se aplica a un sujeto cuyo tipo de lesión hepática se determina mediante el método de prueba de cualquiera de los puntos 1 a 11 mencionados anteriormente.

Efectos ventajosos de la invención

10

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse el método de prueba que comprende medir un nivel de LCA en una muestra biológica recolectada de un sujeto y discriminar un tipo de lesión hepática mediante el uso del nivel medido de LCA como un indicador.

15

El método de prueba de acuerdo con la presente invención se usa solo o en combinación con la medición de los parámetros bioquímicos que se ha realizado hasta ahora, y permite de este modo el diagnóstico temprano de los tipos de lesiones hepáticas en base a los síntomas clínicos, específicamente, del tipo lesión hepatocelular, del tipo colestasis, y un tipo mixto de estos, y la determinación temprana de una estrategia terapéutica. El método de prueba de acuerdo con la presente invención puede usarse en un examen para la enfermedad hepática y es extremadamente útil como un método para ayudar al diagnóstico y al tratamiento de la enfermedad hepática.

20

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista para ilustrar una ruta metabólica de los ácidos biliares.

25

La Figura 2 es una vista para ilustrar un método de discriminación de un tipo de lesión hepática mediante el uso de un valor de corte de un nivel de LCA.

La Figura 3 es una vista esquemática para ilustrar que en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el nivel de LCA muestra una tendencia a aumentar significativamente y un nivel de UDCA muestra una tendencia a disminuir significativamente en los componentes del ácido biliar. Los niveles de CA y CDCA, que tienen una relación isomérica con UDCA, tienden a disminuir sin diferencias significativas y un nivel de DCA tiende a aumentar sin diferencias significativas.

30

La Figura 4 es una vista esquemática para ilustrar que en la lesión hepática de tipo colestasis, ambos niveles de LCA y DCA muestran una tendencia a aumentar significativamente en los componentes del ácido biliar. Todos los niveles de CDCA, UDCA, y CA muestran una tendencia a disminuir sin diferencia significativa.

35

Descripción de las modalidades

Las abreviaturas de los componentes del ácido biliar usadas en esta descripción se muestran en la Tabla 1. En esta descripción, los nombres de los componentes del ácido biliar a veces se describen como las abreviaturas mostradas en la Tabla 1.

40

Tabla 1

Componentes del ácido biliar	Abreviaturas
Ácido cólico	CA
Ácido glicocólico	GCA
Ácido taurocólico	TCA
Ácido desoxicólico	DCA
Ácido glicodesoxicólico	GDCA
Ácido taurodesoxicólico	TDCA
Ácido quenodesoxicólico	CDCA
Ácido glicoquenodesoxicólico	GCDCA
Ácido tauroquenodesoxicólico	TCDCA
Ácido ursodesoxicólico	UDCA
Ácido glicoursodesoxicólico	GUDCA
Ácido tauroursodesoxicólico	TUDCA

65

	Ácido litocólico	LCA
	Ácido glicolítico	GLCA
5	Ácido taurolitocólico	TLCA
	Ácido 12-cetolítico	12_KLCA
	Ácido $\alpha$ -muricólico	$\alpha$ MCA
10	Ácido $\beta$ -muricólico	$\beta$ MCA
	Ácido tauro- $\beta$ -muricólico	T $\beta$ MCA
	Ácido hiocólico	HCA
15	Ácido glicohiocólico	GHCA
	Ácido taurohiocólico	THCA
	Ácido hiodesoxicólico	HDCA

20

La presente invención se refiere a un método de prueba para lesión hepática, y más en particular, a un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, como se define en las reivindicaciones. El método de prueba de acuerdo con la presente invención comprende medir un nivel de LCA en una muestra biológica recolectada de un sujeto, y discriminar un tipo de lesión hepática mediante el uso del nivel medido de LCA como un indicador. La discriminación de un tipo de lesión hepática mediante el uso del nivel de LCA como un indicador puede realizarse comparando el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA. Un ejemplo del método de prueba de acuerdo con la presente invención puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, que comprende medir un nivel de LCA en una muestra biológica recolectada de un sujeto, y que comprende además comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA.

25

30

En el método de prueba de acuerdo con la presente invención, puede medirse un nivel de un biomarcador diferente de LCA, el biomarcador que se asocia con un tipo de lesión hepática, además del nivel de LCA, y el tipo de lesión hepática puede discriminarse mediante el uso del nivel de LCA y el nivel del biomarcador como indicadores.

35

Los ejemplos del biomarcador diferente de LCA, el biomarcador que se asocia con un tipo de lesión hepática, puede incluir UDCA y colágeno tipo IV, que se asocian con lesión hepática de tipo lesión hepatocelular. Además, como un biomarcador asociado con la lesión hepática de tipo colestasis, pueden proporcionarse, por ejemplo, DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS.

40

El método de prueba de acuerdo con la presente invención puede realizarse solo o en combinación con diversos métodos de prueba, tal como la medición de parámetros bioquímicos, que hasta ahora se ha realizado.

45

El "tipo de lesión hepática" como se usa en la presente descripción significa un tipo a clasificar en base a los síntomas de lesión hepática. Los "síntomas de lesión hepática" se refieren a diversas dolencias y hallazgos de exámenes que son presentados por un paciente con lesión hepática. Los ejemplos específicos del "tipo de lesión hepática" pueden incluir el tipo lesión hepatocelular y el tipo colestasis. En el tipo lesión hepatocelular, una célula del parénquima hepático, que es una de las células que constituyen el hígado y representa la mayoría de las partes principales del hígado, se daña, y se provoca una marcada reducción de la función hepática. El tipo colestasis es provocado por el bloqueo de la excreción de la bilis desde el hígado debido a algunas causas, con el resultado de que la excreción anormal de la bilis se produce sobre una parte o todo el sistema de conductos biliares intrahepáticos o extrahepáticos, y de este modo la bilis se acumula en el hígado y la sangre. Después, se inducen diversos síntomas tales como ictericia y hepatitis.

50

55

El método de prueba de acuerdo con la presente invención puede discriminar el tipo lesión hepatocelular y el tipo colestasis, y puede discriminar también un tipo clasificado como de tipo lesión hepatocelular y de tipo colestasis, que es, un tipo mixto.

60

El "sujeto" a someter al método de prueba de acuerdo con la presente invención significa un individuo que se ha diagnosticado con disfunción hepática y/o con sospecha de disfunción hepática en base a algunos resultados de las pruebas. El "sujeto" abarca un individuo que tiene una enfermedad hepática clasificada como hepatitis viral, lesión hepática inducida por fármacos, lesión hepática alcohólica, lesión hepática autoinmunitaria, lesión hepática metabólica, o similares y/o con sospecha de la enfermedad hepática. Se prefiere un individuo que se ha diagnosticado con disfunción hepática.

65

La "muestra biológica" como se usa en la presente descripción no se limita particularmente siempre que la muestra contenga los componentes del ácido biliar, y un ejemplo preferido de esta puede ser una muestra que puede contener un marcador de fibrosis hepática y/o un marcador de estrés oxidativo además de los componentes del ácido biliar. Los

ejemplos específicos de estas pueden incluir sangre aislada de un sujeto, y suero y plasma preparado a partir de la sangre, preferentemente suero.

Un "agente terapéutico para lesión hepática" y un "método de tratamiento de lesión hepática" como se usa en la presente descripción incluyen los ejemplos tales como agentes terapéuticos para lesión hepática y métodos de tratamiento de lesión hepática que se describen en "Manual for handling disorders due to adverse drug reactions, Drug-induced liver injury," y medicamentos y métodos de tratamiento que se realizan en instalaciones médicas. En el caso del tipo lesión hepatocelular, por ejemplo, se realiza una inyección intravenosa de formulación Neo-Minophagen C más fuerte que es una formulación de glicirricina y tiene una acción antialérgica, así como la administración oral de UDCA que tiene una acción protectora de membrana de hepatocitos. Cuando aumenta la gravedad de la lesión hepatocelular hasta inducir la hepatitis fulminante se usa, por ejemplo, la hiperalimentación intravenosa (IVH) o el soporte hepático artificial. En el caso del tipo colestasis se administra, por ejemplo, vitamina A o vitamina K para cubrir la pérdida de una vitamina liposoluble y después se usa UDCA, prednisolona, fenobarbital, taurina, colestimida, o similares como un medicamento.

LCA es uno de los ácidos biliares. Los ácidos biliares se producen a partir del metabolismo del colesterol en hepatocitos del hígado, seguido por la conjugación con glicina y taurina (ácido aminoetilsulfónico) o similares, y después se excretan como bilis, la cual juega un papel importante en la digestión y absorción de grasa. LCA es un ácido biliar secundario producido de tal manera que el CDCA, que es uno de los ácidos biliares primarios sintetizados en el hígado, se excreta a través del conducto biliar en el tracto gastrointestinal y se somete a una reacción de deshidratación y oxidación por la 7- $\alpha$  deshidroxilasa.

En una población de pacientes con lesión hepática, cuando los niveles de LCA en suero se compararon entre pacientes con lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y pacientes con lesión hepática de tipo colestasis, el nivel de LCA mostró una tendencia a ser alto en los pacientes con lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, y, por el contrario, el nivel de LCA mostró una tendencia a ser bajo en los pacientes con lesión hepática de tipo colestasis. Además, en la lesión hepática de tipo colestasis, un nivel de DCA en suero mostró una tendencia a ser bajo y un nivel de SSBA mostró una tendencia a ser alto. Mientras tanto, en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, un nivel de UDCA en suero mostró una tendencia a ser bajo. Los niveles de conjugados de taurina y conjugados de glicina de diversos ácidos biliares también mostraron una tendencia a ser similares a los niveles de los componentes en una forma libre. Puede considerarse que: en la lesión hepática de tipo colestasis, la producción de DCA y LCA se suprime por la colestasis, que está acompañado por un aumento en los niveles de CA, CDCA, y UDCA; y, por el contrario, en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, la producción de DCA y LCA, que tienen alta lipofiliencia, se potencia, lo que da como resultado la supresión de la producción de CA, CDCA, y UDCA.

En la lesión hepática de tipo colestasis, además del nivel de LCA, los niveles de colágeno tipo IV y HA, que son marcadores de fibrosis hepática, y ROS, que es un marcador de estrés oxidativo, en suero también mostraron una tendencia a ser altos. Mientras tanto, en la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el nivel de colágeno tipo IV en suero mostró una tendencia a ser alto.

La discriminación de un tipo de lesión hepática puede realizarse comparando los valores de los elementos de medición a sus valores de corte predeterminados. El "valor de corte" significa un valor que distingue entre un intervalo positivo y un intervalo negativo. Los valores de corte de los elementos de medición pueden establecerse individualmente para los tipos de lesión hepática. El valor de corte puede establecerse de acuerdo con un método bien conocido. Por ejemplo, el valor de corte puede establecerse mediante el uso del análisis de ROC, que se usa en general como un método para investigar la utilidad de un examen diagnóstico. En el análisis de ROC, cuando se cambian los umbrales, se prepara una curva ROC que grafica la sensibilidad para cada umbral en el eje vertical y una fracción de falsos positivos (FPF, tasa de falsos positivos: 1-especificidad) en el eje horizontal. En el caso del examen sin capacidad diagnóstica, la curva ROC forma una línea recta diagonal. Mientras tanto, junto con una mejora de una capacidad diagnóstica del examen, la línea diagonal forma una curva que tiene un arco hacia la izquierda. En el caso del examen con una capacidad de diagnóstico del 100 %, la línea diagonal forma una curva que pasa de un lado izquierdo a un lado superior. Para establecer el valor de corte, se proporciona como un ejemplo un método en base al hecho de que una curva ROC de variables independientes que tiene sensibilidad y especificidad excelente, se acerca a la esquina superior izquierda, en la cual un punto que tiene la mínima distancia desde la esquina superior izquierda se establece como un valor de corte. Alternativamente, puede proporcionarse un método en el cual un punto más alejado de la línea diagonal de puntos en un área bajo la curva (abreviado como AUC) de 0.500 en una curva ROC se establece como un valor de corte, es decir, (sensibilidad+especificidad-1) se calcula y un punto máximo entre los valores obtenidos, es decir, el índice de Youden puede establecerse como el valor de corte. En la presente descripción, la "sensibilidad" significa una tasa de positivos verdaderos. Además, la "especificidad" significa una tasa de negativos verdaderos. Además, en un método alternativo, el valor de corte puede establecerse cuantitativamente en base a la relación entre cada uno de los elementos de medición y la frecuencia de un tipo de lesión hepática.

La discriminación de un tipo de lesión hepática por el método de prueba de acuerdo con la presente invención se describe con referencia a la Figura 2. Cuando el nivel de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el tipo de lesión hepática se determina como del tipo lesión hepatocelular. Cuando el nivel de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el tipo de lesión hepática se determina como del tipo colestasis.

Además, cuando el nivel de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el tipo de lesión hepática se determina como un tipo que contiene tanto el tipo lesión hepatocelular como el tipo colestasis, es decir, un tipo mixto. Además, para una discriminación más detallada, cuando el nivel de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el tipo de lesión hepática se determina como del tipo lesión hepatocelular en el cual el tipo mixto no se incluye. Además, cuando el nivel de LCA es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el tipo de lesión hepática se determina como del tipo colestasis en el cual el tipo mixto no se incluye.

En el método de prueba de acuerdo con la presente invención, puede medirse cualquiera o ambos niveles de UDCA y de colágeno tipo IV además del nivel de LCA. El nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV se compara con el valor de corte predeterminado correspondiente. Cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV satisface cualquiera de los siguientes, el tipo de lesión hepática puede determinarse como del tipo lesión hepatocelular: (1) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular; (2) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular; y (3) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular.

En el método de prueba de acuerdo con la presente invención, pueden medirse cualquiera o más de los niveles de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS además del nivel de LCA. Cada uno de los niveles medidos se compara con el valor de corte predeterminado correspondiente. Cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA y los niveles medidos de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS satisfacen cualquiera o dos o más de los siguientes, el tipo de lesión hepática puede determinarse como del tipo colestasis: (4) el nivel de DCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de DCA; (5) el nivel de SSBA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de SSBA; (6) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV; (7) el nivel de HA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de HA; y (8) el nivel de ROS es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de ROS.

En el método de prueba de acuerdo con la presente invención, puede medirse un nivel de colágeno tipo IV además del nivel de LCA. El nivel medido se compara con el valor de corte predeterminado correspondiente. Cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y cuando el nivel medido de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV, el tipo de lesión hepática puede determinarse como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y del tipo colestasis.

Los ejemplos específicos de los valores de corte de los elementos de medición usados en el método de prueba de acuerdo con la presente invención se muestran en Tabla 2-1 y la Tabla 2-2. La tabla 2-1 muestra los ejemplos específicos de los valores de corte de biomarcadores para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular. La Tabla 2-2 muestra los ejemplos específicos de los valores de corte de biomarcadores para identificar la lesión hepática de tipo colestasis. Cada uno de los valores de corte mostrados como ejemplos es un valor de corte predeterminado midiendo los niveles de biomarcadores mediante el uso de, como una muestra biológica, una muestra sérica recolectada de un paciente con lesión hepática sin la aplicación de algún agente terapéutico para lesión hepática, comparando los niveles medidos de biomarcadores entre un grupo de pacientes con lesión hepática y pacientes con lesión hepática de tipo lesión hepatocelular o pacientes con lesión hepática de tipo colestasis mediante el análisis de ROC, y determinando el índice de Youden en los Ejemplos descritos más adelante. El valor de corte también puede establecerse para cada instalación de medición o población a medir. El establecimiento puede cambiarse apropiadamente mediante el almacenamiento de los datos medidos en un nivel de un biomarcador de interés para las mismas muestras como se describió anteriormente, y realizando el análisis de acuerdo con el mismo enfoque analítico como se describió anteriormente. Además, cuando se realiza la medición de un nivel de un biomarcador mediante el uso de una muestra diferente de la muestra sérica, el valor de corte puede establecerse apropiadamente de acuerdo con el mismo enfoque analítico como se describió anteriormente mediante el análisis de los datos medidos en cada uno de los niveles de biomarcadores de la muestra a usar.

60

65

Tabla 2-1

		Valores de corte
Componentes del ácido biliar	LCA (nmol/ml)	≥0.01985
	UDCA (nmol/ml)	≤0.903
Marcador de fibrosis hepática	Colágeno tipo IV (ng/ml)	≥128

Tabla 2-2

		Valores de corte
Componentes del ácido biliar	LCA (nmol/ml)	≤0.0241
	DCA (nmol/ml)	≤0.175
	SSBA (nmol/ml)	≥21.1
Marcador de estrés oxidativo	ROS (U)	≥216
Marcadores de fibrosis hepática	Colágeno tipo IV (ng/ml)	≥288
	HA (ng/ml)	≥47

Se proporciona una descripción de un ejemplo específico del caso donde el método de prueba de acuerdo con la presente invención se realiza mediante el uso de los valores de corte específicos ejemplificados en la Tabla 2-1 y la Tabla 2-2 anteriores.

Un ejemplo específico del método de prueba descrito puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA; y  
 determinar el tipo de lesión hepática como del tipo lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, en el cual el valor de corte es de 0.0195 nmol/L.

Además, otro ejemplo específico del método de prueba puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA; y  
 determinar el tipo de lesión hepática como del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, en el cual el valor de corte es de 0.0241 nmol/L.

Aún otro ejemplo específico del método de prueba puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA; y  
 determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular es de 0.0195 nmol/L y el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis es de 0.0241 nmol/L.

Además, otro ejemplo específico del método de prueba puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA;  
 medir adicionalmente cualquiera o ambos niveles de UDCA y de colágeno tipo IV;  
 5 comparar el nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV con el valor de corte predeterminado del nivel de UDCA y/o  
 de colágeno tipo IV; y  
 determinar el tipo de lesión hepática como del tipo lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor  
 que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el  
 nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV satisface cualquiera de los siguientes:  
 10 (1) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión  
 hepática de tipo lesión hepatocelular;  
 (2) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para  
 identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular;  
 (3) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión  
 15 hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que el valor de corte predeterminado  
 del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular,

en el cual el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular  
 es de 0.0195 nmol/L, el valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión  
 hepatocelular es de 0.903 nmol/L, y el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión  
 20 hepática de tipo lesión hepatocelular es de 128 ng/ml.

Además, otro ejemplo específico del método de prueba puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión  
 hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

25 medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA;  
 medir adicionalmente uno o más de los niveles de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS,  
 comparar cada uno de los niveles medidos obtenidos mediante la medición adicional con el valor de corte predeterminado  
 correspondiente; y  
 30 determinar el tipo de lesión hepática como del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un  
 valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y los niveles medidos  
 de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS satisfacen cualquiera o dos o más de los siguientes:  
 (4) el nivel de DCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión  
 35 hepática de tipo colestasis;  
 (5) el nivel de SSBA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión  
 hepática de tipo colestasis;  
 (6) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para  
 identificar la lesión hepática de tipo colestasis;  
 40 (7) el nivel de HA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática  
 de tipo colestasis; y  
 (8) el nivel de ROS es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión  
 hepática de tipo colestasis,

45 en el cual: el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis es de  
 0.0241 nmol/L; el valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis es  
 de 0.175 nmol/L; el valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis  
 es de 21.1 nmol/L; el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo  
 colestasis es de 288 ng/ml; el valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática de tipo  
 50 colestasis es de 47 ng/ml; y el valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión hepática de tipo  
 colestasis es de 216 U.

Además, otro ejemplo específico del método de prueba puede ser un método de prueba para discriminar un tipo de lesión  
 hepática, el método de prueba que incluye las etapas de:

55 medir un nivel de LCA en una muestra sérica recolectada de un sujeto;  
 comparar el nivel medido de LCA con un valor de corte predeterminado del nivel de LCA;  
 medir adicionalmente un nivel de colágeno tipo IV en la muestra sérica;  
 comparar el nivel medido de colágeno tipo IV con un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV; y  
 60 determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y del tipo colestasis cuando el nivel  
 medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo  
 lesión hepatocelular, y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática  
 de tipo colestasis y cuando el nivel medido de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado  
 del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis,  
 65 en el cual: el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular  
 y el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis son de 0.0195

nmol/L y 0.0241 nmol/L, respectivamente; y el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis es de 288 ng/ml.

5 La medición de los niveles de los componentes del ácido biliar puede realizarse mediante un método que se ha usado hasta ahora para la medición. Los ejemplos de estos pueden incluir espectrometría de masas en serie acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS) y espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC/MS). Además, los niveles de ácido biliar o ácido biliar sulfatado pueden medirse con un kit de medición de ácido biliar comercialmente disponible. Por ejemplo, la medición del nivel de ácido biliar sulfatado puede realizarse con un kit para ácidos biliares UBASTEC-AUTO (UBAS) (LBS Co., Ltd.). Los métodos de medición no se limitan a estos y puede usarse cualquier método para la medición siempre que el método pueda medir los ácidos biliares y componentes de estos.

15 La medición del nivel de colágeno tipo IV puede realizarse mediante un método que se ha usado hasta ahora para la medición. Por ejemplo, la medición del nivel de colágeno tipo IV puede realizarse con un kit de reactivos de medición de colágeno tipo IV comercialmente disponible. Los ejemplos de tal método pueden incluir inmunoensayo enzimático (EIA) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en los cuales se usa un anticuerpo dirigido a colágeno tipo IV. Específicamente, puede medirse un nivel de colágeno tipo IV-7S como se describió anteriormente. Se añade anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV humano a una muestra biológica para producir un complejo (complejo 1) de colágeno tipo IV-7S y anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV humano, seguido de la adición de colágeno tipo IV-7S humano (antígeno marcado) marcado con un radioisótopo, tal como yodo-125 (<sup>125</sup>I), para formar un complejo (complejo 2) con anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV 7S humano que no se une al colágeno tipo IV-7S en la muestra. Posteriormente, se añade suero de cabra anti-γ-globulina de conejo (anticuerpo de cabra) al complejo 2, lo que da como resultado una reacción del anticuerpo de cabra con el complejo 2 para formar un complejo de antígeno marcado, anticuerpo anti-colágeno tipo IV-7S humano, y anticuerpo policlonal de conejo-anticuerpo de cabra. El precipitado resultante se recolecta y se mide su reactividad para determinar el nivel de colágeno tipo IV-7S.

25 La medición del nivel de HA puede realizarse mediante un método que se ha usado hasta ahora para la medición. Por ejemplo, el nivel de HA puede medirse con un kit de reactivos para la medición de HA comercialmente disponible. Un ejemplo de tal método puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en el cual se usa un anticuerpo dirigido a HA.

30 La medición del nivel de ROS puede realizarse mediante un método que se ha usado hasta ahora para la medición. Por ejemplo, el nivel de ROS puede medirse con un kit de reactivos para la medición de ROS comercialmente disponible. Específicamente, una cantidad total de sustancias que producen radicales libres pueden medirse como se describió anteriormente. Los radicales libres (ROO· o RO·) se generan a partir de un peróxido (ROOH) mediante la reacción de Fenton en la cual un ion de un metal, tal como hierro, se usa como un catalizador, y los radicales libres generados se dejan reaccionar con sulfato de N,N-dietil-1,4-fenileno-diamina (abreviado como DEPPD). Después, el DEPPD+ generado mediante la reacción se somete a la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm.

40 La presente invención abarca un método de selección de un agente terapéutico para lesión hepática de acuerdo con un tipo de lesión hepática, que se aplica a un sujeto cuyo tipo de lesión hepática se determina mediante el método de prueba de acuerdo con la presente invención.

45 La presente descripción abarca además un método de tratamiento de la lesión hepática de acuerdo con un tipo de lesión hepática, que se aplica a un sujeto cuyo tipo de lesión hepática se determina mediante el método de prueba de acuerdo con la presente invención.

50 Los ejemplos del agente terapéutico para lesión hepática y el método de tratamiento de lesión hepática de acuerdo con un tipo de lesión hepática incluye los agentes terapéuticos para lesión hepática y el método de tratamiento de lesión hepática que se describen en "Manual for handling disorders due to adverse drug reactions, Drug-induced lesión hepática," y los medicamentos y los métodos de tratamiento que se realizan en las instalaciones médicas. En el caso del tipo lesión hepatocelular, por ejemplo, se realiza la inyección intravenosa de la formulación C Neo-Minophagen más fuerte que es una formulación de glicirricina y tiene una acción antialérgica, así como la administración oral de UDCA. Cuando aumenta la gravedad de la lesión hepatocelular hasta inducir la hepatitis fulminante se usa, por ejemplo, la hiperalimentación intravenosa (IVH) o el soporte hepático artificial. En el caso del tipo colestasis se administra, por ejemplo, vitamina A o vitamina K para cubrir la pérdida de una vitamina liposoluble y después se usa UDCA, prednisolona, fenobarbital, taurina, colestimida, o similares como un medicamento.

60 Ahora, la presente invención se describe específicamente a modo de Ejemplos. Sin embargo, no se considera que la presente invención se limite a estos Ejemplos.

#### Ejemplo 1

65 Para encontrar un biomarcador útil que permita el diagnóstico temprano de un tipo de lesión hepática, se usaron las muestras séricas obtenidas de pacientes con lesión hepática y de voluntarios sanos para medir los niveles de componentes del ácido biliar, y un marcador de estrés oxidativo y un marcador de fibrosis hepática. La recolección de las

muestras séricas y un experimento en serie se realizaron después de obtener los consentimientos de los donantes de muestras, es decir, los pacientes y los voluntarios sanos.

#### 1. Muestra del sujeto

Bajo la aprobación de los comités de ética de Daiichi Sankyo Co., Ltd. y la Escuela de Medicina de la Universidad de Jikei, se recolectaron 304 muestras séricas de 150 pacientes con sospecha de lesiones hepáticas durante aproximadamente 2 años, tales como lesiones hepáticas virales, autoinmunitarias, alcohólicas y genéticas. Además, se usaron muestras séricas de individuos sanos obtenidas mediante la recolección de sangre de los voluntarios. Las muestras séricas se almacenaron a -80 °C hasta que se midieron los biomarcadores.

#### 2. Elementos de evaluación

Se midieron los niveles de componentes del ácido biliar, específicamente, 24 tipos de componentes del ácido biliar, es decir, CA, DCA, CDCA, UDCA, LCA, 12\_KLCA,  $\alpha$ MCA,  $\beta$ MCA, HDCA, GCA, GDCA, GCDCA, GUDCA, GLCA, GHCA, GHCA, GHDCA, TCA, TDCA, TCDCA, TUDCA, TLCA, T $\beta$ MCA, THCA, y THDCA, y ácido biliar sulfatado sérico (SSBA).

Además, se midieron los niveles de ALT, AST, ALP,  $\gamma$ -GTP, bilirrubina total (de aquí en adelante abreviada como T.BIL), bilirrubina directa (de aquí en adelante abreviada como D.BIL), TBA, y albúmina (de aquí en adelante abreviada como ALB), y el tiempo de protrombina (de aquí en adelante abreviado como PT), que eran parámetros bioquímicos. Además, se midieron los niveles de 8-OHdG y ROS, que eran marcadores de estrés oxidativo, así como de colágeno tipo IV y de HA, que eran marcadores de fibrosis hepática.

#### 3. Método de medición

Un total de 24 tipos de componentes del ácido biliar se midieron mediante un método de LC-MS/MS. El límite mínimo de determinación fue de 0.03 nmol/ml solo para 12-KLCA y 0.01 nmol/ml para otras sustancias a medir. El límite máximo de determinación es de 10 nmol/ml solo para 12-KLCA y CA y 30 nmol/ml para otras sustancias a medir. Se usó Naptalam como un estándar interno (IS). Se usó ACQUITY UPLC BEH C18 de 1.7 m y 2.1×50 mm (fabricado por Waters Corporation) para una columna. Se usaron ácido fórmico al 0.1 % y acetonitrilo para una fase móvil, cuya relación se cambió de acuerdo con el tiempo de medición. La ionización por electrospray (abreviado como ESI) negativa se seleccionó para la ionización y el registro iónico seleccionado (abreviado como SIR) se seleccionó para un método de detección. Se usó la desproteización como pretratamiento. Se midió un nivel de ácido biliar sulfatado con BioMajesty JCA-BM2250 (JEOL Ltd.) mediante el uso de 300  $\mu$ L de suero y un kit para medir ácidos biliares UBASTEC-AUTO (UBAS) (LBS Co., Ltd.).

Se midieron 8-OHdG y ROS, que eran marcadores de estrés oxidativo, como se describió anteriormente. Se midió 8-OHdG con un kit de reactivos comercialmente disponible del Instituto de Japón para el Control del Envejecimiento. Para la medición de ROS, los radicales libres (ROO $\cdot$  o RO $\cdot$ ) se generan a partir de un peróxido (ROOH) mediante la reacción de Fenton en la cual un ion de un metal, tal como hierro, se usa como un catalizador, y los radicales libres generados se dejan reaccionar con sulfato de N,N-dietil-1,4-fenilen-diamina (abreviado como DEPPD). El DEPPD $\cdot$ + generado mediante la reacción tiene una absorción a una longitud de onda de 505 nm. Después, la medición de la absorbancia se realizó para determinar una cantidad total de sustancias que producen radicales libres.

Los parámetros bioquímicos se midieron mediante los métodos que se usaron en general en los exámenes de laboratorio.

El colágeno tipo IV $\cdot$ 7S y HA, que eran marcadores de fibrosis hepática, se midieron como se describió anteriormente. El colágeno tipo IV $\cdot$ 7S se dejó reaccionar con anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV humano para producir un complejo de colágeno tipo IV $\cdot$ 7S-anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV humano (complejo 1). Después, se añadió colágeno tipo IV $\cdot$ 7S humano marcado con yodo-125 ( $^{125}$ I) (antígeno marcado) para que reaccionara con el anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV $\cdot$ 7S humano que no pudo unirse al colágeno tipo IV $\cdot$ 7S en la muestra, lo que da como resultado la formación de un complejo de antígeno marcado-anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno tipo IV $\cdot$ 7S humano (complejo 2). Posteriormente, se añadió suero de cabra anti- $\gamma$ -globulina de conejo (anticuerpo de cabra) para dejar reaccionar el anticuerpo de cabra con el complejo 2, lo que da como resultado la formación de un complejo del antígeno marcado, el anticuerpo anti-colágeno tipo IV $\cdot$ 7S humano, y el anticuerpo policlonal de conejo-anticuerpo de cabra como un precipitado. Después de eliminar el antígeno marcado sin reaccionar, se midió la radioactividad del precipitado y se determinó un nivel de colágeno tipo IV $\cdot$ 7S. Se midió HA con un kit HA ELISA (fabricado por Cosmo Bio Co., Ltd.).

#### 4. Método de análisis de datos

Se analizó la correlación de las variaciones en diversos biomarcadores y síntomas de lesión hepática determinada de forma integral. Se usaron 304 de las muestras séricas obtenidas de 150 pacientes con lesión hepática y se calcularon las estadísticas de resumen de la información de fondo. El análisis se realizó sin tener en cuenta la correlación entre muestras en el mismo caso.

Para investigar los biomarcadores asociados con la identificación de los tipos de lesión hepática en base a los síntomas, se usó un modelo de regresión logística multivariable ajustado por los factores de fondo del paciente para calcular la relación de probabilidades para los síntomas de lesión hepática determinada de forma integral por factores candidatos de biomarcadores (lesión hepatocelular o colestasis) con el intervalo de confianza del 95 %. Como los factores candidatos de biomarcadores, se usaron los niveles de componentes del ácido biliar, de marcadores de estrés oxidativo, y de marcadores de fibrosis hepática. Se usaron el sexo, la edad, el BMI, el consumo de alcohol, los fármacos terapéuticos para lesión hepática (agente antiviral, agente de protección hepática, la formulación de ácidos biliares, la formulación de aminoácidos/fármaco mejorador de hipoalbuminemia, y la formulación de vitamina K), y las complicaciones (dislipidemia, diabetes, ictericia obstructiva, y cálculos biliares) como los factores de fondo del paciente.

La presencia o ausencia de síntomas de lesión hepática se determinó en base a los resultados de la evaluación proporcionados por dos o más investigadores adoptados a partir de los resultados de la evaluación proporcionados por tres investigadores independientes. Las muestras se usaron como una unidad de análisis total y el análisis se realizó sin tener en cuenta la correlación entre las muestras en el mismo caso. Se adoptó un nivel de significación bilateral del 5 % cuando se realizó una prueba estadística.

En el análisis de biomarcadores, para los indicadores sin valores de referencia, se establecieron los percentiles del 97.5 de los valores medidos de individuos sanos (que corresponden a la media+2SD en el caso de la distribución normal) como valores de referencia, y los valores mayores que los valores de referencia se categorizaron en valores altos y los valores menores que los valores de referencia se categorizan en valores bajos.

Después, para determinar las escalas de evaluación objetivas de los biomarcadores asociados con los síntomas de lesión hepática, se usaron las muestras séricas de pacientes sin la aplicación de un agente terapéutico para la lesión hepática para calcular los valores de corte de los biomarcadores que identifican la presencia o ausencia de síntomas de lesión hepática. Aunque el cálculo de un valor de corte puede realizarse mediante diversos procedimientos, el valor de corte se estableció a un valor que se derivó a través del análisis ROC para maximizar la suma de la sensibilidad y la especificidad.

## 5. Resultados

La información de fondo sobre los pacientes quienes proporcionaron sus muestras séricas se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

		Pacientes con lesión hepática		
Número de muestras evaluadas		304		
	Sexo	Hombre	126 (41.4)	
		Mujer	178 (58.6)	
5	Edad (años)	Media (desviación estándar)	61.0 (15.2)	
		<65	160 (52.6)	
		>=65	144 (47.4)	
10	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Media (desviación estándar)	23.6 (3.9)	
		<25	198 (65.1)	
		>=25	95 (31.3)	
		Imposible de calcular	11 (3.6)	
	Consumo de alcohol	No	247 (81.3)	
		Sí	50 (16.4)	
		Desconocido	7 (2.3)	
15	Fármacos terapéuticos para lesión hepática	Agente antiviral (interferón)	Sí	24 (7.9)
	Fármacos usualmente tomados (hasta ahora)	Fármaco de protección hepática (formulación de glicirricina etc.)	Sí	44 (14.5)
20		Formulación de ácidos biliares (ácido ursodesoxicólico)	Sí	166 (54.6)
		Formulación de aminoácidos o fármaco mejorador de hipoalbuminemia)	Sí	69 (22.7)
		Absorbente de ácidos biliares	Sí	5 (1.6)
		Formulación de vitamina K	Sí	51 (16.8)
25		Yubera N/EPL	Sí	35 (11.5)
		Medicina de hierbas (inchinkoto etc.)	Sí	3 (1.0)
		Otros	Sí	3 (1.0)
30	Otros fármacos combinados	Fármaco terapéutico para hiperlipidemia (estatina)	Sí	21 (6.9)
	Fármacos usualmente tomados (hasta ahora)	Fármaco terapéutico para hiperlipidemia (ezetimiba)	Sí	10 (3.3)
		Fármaco terapéutico para hiperlipidemia (basado en fibrato)	Sí	3 (1.0)
35		Fármaco terapéutico para hiperlipidemia (nicotinato de tocoferol/EPL)	Sí	31 (10.2)
		Fármaco depresor	Sí	109 (35.9)
		Fármaco terapéutico para diabetes	Sí	33 (10.9)
40	Complicaciones	Dislipidemia	Sí	57 (18.8)
		Diabetes	Sí	61 (20.1)
		Ictericia obstructiva	Sí	12 (3.9)
		Cálculos renales	Sí	58 (19.1)
		Otros	Sí	36 (11.8)
45		ALT (U/L)	Mediana (intervalo intercuartil)	56.0 (30.5, 92.5)
		AST (U/L)	Mediana (intervalo intercuartil)	55.0 (37.5, 99.5)
		ALP (U/L)	Mediana (intervalo intercuartil)	290.0 (231.0, 420.5)
		γ-GTP (U/L)	Mediana (intervalo intercuartil)	67.0 (32.0, 156.0)
50	Parámetros bioquímicos	T.BIL (mg/dl)	Mediana (intervalo intercuartil)	1.1 (0.7, 1.7)
		D.BIL (mg/dl)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.1 (0.1, 0.3)
		TBA (μmol/L)	Mediana (intervalo intercuartil)	18.0 (7.7, 42.3)
		ALB (g/dl)	Mediana (intervalo intercuartil)	3.7 (3.2, 4.1)
		PT (%)	Mediana (intervalo intercuartil)	84.0 (73.0, 96.0)
55		LCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0324 (0.0154, 0.0747)
		12_KLCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0393 (0.0199, 0.0832)
		UDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.6915 (0.0721, 4.9150)
		HDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0000 (0.0000, 0.0055)
		CDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.4340 (0.1070, 1.1700)
60	Niveles de componentes del ácido biliar	DCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.2090 (0.0220, 0.7135)
		αMCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0000 (0.0000, 0.0030)
		βMCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0000 (0.0000, 0.0040)
		CA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.1020 (0.0404, 0.3495)
		GLCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0224 (0.0105, 0.0719)
		GUDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	2.9600 (0.2165, 12.2000)
		GHDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	0.0000 (0.0000, 0.0022)
65		GCDCA (nmol/ml)	Mediana (intervalo intercuartil)	3.7000 (1.6100, 8.6450)

	<b>GDCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.4890 (0.0366, 1.2650)</b>	
	<b>GHCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0442 (0.0213, 0.1125)</b>	
	<b>GCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.9725 (0.4075, 3.0050)</b>	
5	<b>TLCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0092 (0.0021, 0.0311)</b>	
	<b>TUDCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.1520 (0.0165, 1.0800)</b>	
	<b>THDCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0000 (0.0000, 0.0001)</b>	
	<b>TCDCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.7400 (0.2945, 2.9950)</b>	
	<b>TDCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0867 (0.0205, 0.2635)</b>	
10	<b>TβMCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0013 (0.0000, 0.0482)</b>	
	<b>THCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.0076 (0.0012, 0.0254)</b>	
	<b>TCA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.2435 (0.0648, 1.0300)</b>	
	<b>SSBA (nmol/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>15.80 (8.78, 28.46)</b>	
	<b>Marcadores de estrés oxidativo</b>	<b>8-OHdG (ng/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>0.16 (0.12, 0.22)</b>
		<b>ROS (U)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>219.5 (182.5, 258.0)</b>
15	<b>Marcadores de estrés oxidativo</b>	<b>Colágeno tipo IV (ng/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>186.5 (136.0, 258.0)</b>
		<b>HA (ng/ml)</b>	<b>Mediana (intervalo intercuartil)</b>	<b>136.0 (51.5, 388.0)</b>

Los datos están representados por el número de pacientes (%) o mediana (intervalo intercuartil).

Se llevó a cabo un análisis multivariable con ajuste de covariables para biomarcadores que definen los síntomas de lesión hepática identificados para los tipos, y los resultados se muestran en la Tabla 4 y la Tabla 5.

Tabla 4

			Tipo lesión hepatocelular				Tipo colestasis			
			Número de muestras evaluadas	Número de muestras de pacientes con lesión hepática (%)	Relación de proporción (intervalo de confianza del 95 %)	Valor p	Número de muestras de pacientes con lesión hepática (%)	Relación de proporción (intervalo de confianza del 95 %)	Valor p	
30	LCA	<=97,5 pct	144	90 (62.5)	1.00	-	70 (48.6)	1.00	-	
		>97,5 pct	160	125 (78.1)	2.06 (1.16, 3.66)	0.014	32 (20.0)	0.29 (0.16, 0.53)	<0.0001	
35	UDCA	<=97,5 pct	148	109 (73.6)	1.00	-	47 (31.8)	1.00	-	
		>97,5 pct	156	106 (67.9)	0.31 (0.12, 0.77)	0.0112	55 (35.3)	1.69 (0.71, 4.01)	0.235	
35	Niveles de componentes del ácido biliar	CDCA	<=97,5 pct	268	194 (72.4)	1.00	-	85 (31.7)	1.00	-
		>97,5 pct	36	21 (58.3)	0.50 (0.22, 1.13)	0.0950	17 (47.2)	1.98 (0.88, 4.48)	0.0991	
40	Marcadores de estrés oxidativo	DCA	<=97,5 pct	232	160 (69.0)	1.00	-	93 (40.1)	1.00	-
		>97,5 pct	72	55 (76.4)	1.48 (0.74, 2.94)	0.267	9 (12.5)	0.26 (0.11, 0.58)	0.001	
45	Marcadores de fibrosis hepática	CA	<=97,5 pct	261	187 (71.6)	1.00	-	85 (32.6)	1.00	-
		>97,5 pct	43	28 (65.1)	0.75 (0.34, 1.65)	0.470	17 (39.5)	1.36 (0.63, 2.93)	0.427	
45	Marcadores de estrés oxidativo	SSBA	<=97,5 pct	201	137 (68.2)	1.00	-	50 (24.9)	1.00	-
		>97,5 pct	103	78 (75.7)	1.02 (0.49, 2.09)	0.967	52 (50.5)	5.05 (2.45, 10.41)	<0.0001	
45	Marcadores de estrés oxidativo	8-OHdG	<=97,5 pct	292	210 (71.9)	1.00	-	96 (32.9)	1.00	-
		>97,5 pct	12	5 (41.7)	0.26 (0.07, 0.96)	0.0434	6 (50.0)	1.40 (0.35, 5.57)	0.637	
45	Marcadores de estrés oxidativo	ROS	<=97,5 pct	157	111 (70.7)	1.00	-	36 (22.9)	1.00	-
		>97,5 pct	147	104 (70.7)	0.84 (0.47, 1.52)	0.570	66 (44.9)	2.68 (1.49, 4.80)	0.001	
45	Marcadores de fibrosis hepática	Colágeno tipo IV	<=150	80	47 (58.8)	1.00	-	20 (25.0)	1.00	-
		>150	162	128 (79.0)	2.19 (1.05, 4.56)	0.036	62 (38.3)	3.54 (1.62, 7.74)	0.0015	
45	Marcadores de fibrosis hepática	HA	<=50	58	38 (65.5)	1.00	-	13 (22.4)	1.00	-
		>50	182	130 (71.4)	1.20 (0.57, 2.56)	0.629	70 (38.5)	3.66 (1.28, 8.47)	0.0024	

Factores de ajuste: sexo, edad, BMI, consumo de alcohol, fármacos terapéuticos para lesión hepática (agente antiviral, agente de protección hepática, formulación de ácidos biliares, formulación de aminoácidos, fármaco mejorador de hipoalbuminemia, y formulación de vitamina K), y complicaciones (dislipidemia, diabetes, ictericia obstructiva, y cálculo renal)

Tabla 5

5		Tipo lesión hepatocelular				Tipo colestasis		
		Número de muestras evaluadas	Número de muestras de pacientes con lesión hepática (%)	Relación de proporción (intervalo de confianza del 95 %)	Valor p	Número de muestras de pacientes con lesión hepática (%)	Relación de proporción (intervalo de confianza del 95 %)	Valor p
10	12_KLCA <=97.5 pct	235	165 (70.2)	1.00	-	77 (32.0)	1.00	-
	>97.5 pct	69	50 (72.5)	0.88 (0.45, 1.71)	0.70	25 (36.2)	1.03 (0.53, 1.98)	0.939
15	GLCA <=97.5 pct	182	113 (62.1)	1.00	-	74 (40.7)	1.00	-
	>97.5 pct	122	102 (83.6)	2.17 (1.13, 4.15)	0.0195	28 (23.0)	0.56 (0.30, 1.04)	0.0655
20	GUDCA <=97.5 pct	140	104 (74.3)	1.00	-	45 (32.1)	1.00	-
	>97.5 pct	164	111 (67.7)	0.16 (0.05, 0.47)	0.0009	57 (34.8)	2.08 (0.78, 5.55)	0.143
25	GCDCA <=97.5 pct	165	114 (67.9)	1.00	-	36 (21.4)	1.00	-
	>97.5 pct	136	101 (74.3)	1.29 (0.69, 2.42)	0.430	66 (49.5)	4.25 (2.23, 8.10)	<0.0001
30	GDCA <=97.5 pct	255	169 (66.3)	1.00	-	94 (36.9)	1.00	-
	>97.5 pct	49	46 (93.9)	7.34 (2.11, 25.53)	0.0017	8 (16.3)	0.35 (0.15, 0.84)	0.0182
35	GCA <=97.5 pct	220	154 (70.0)	1.00	-	50 (22.7)	1.00	-
	>97.5 pct	84	61 (72.6)	1.98 (0.54, 2.16)	0.824	52 (61.9)	6.11 (3.06, 12.23)	<0.0001
40	TLCA <=97.5 pct	209	132 (63.2)	1.00	-	68 (32.5)	1.00	-
	>97.5 pct	95	83 (87.4)	4.68 (2.01, 10.88)	0.0003	34 (35.8)	1.15 (0.59, 2.24)	0.678
45	TUDCA <=97.5 pct	152	105 (69.1)	1.00	-	46 (30.3)	1.00	-
	>97.5 pct	152	110 (72.4)	0.56 (0.22, 1.42)	0.221	56 (36.8)	3.20 (1.18, 8.64)	0.0221
50	TCDCA <=97.5 pct	175	113 (64.6)	1.00	-	41 (23.4)	1.00	-
	>97.5 pct	129	102 (79.1)	2.31 (1.17, 4.54)	0.0152	61 (47.3)	3.32 (1.76, 6.29)	0.0002
55	TDCA <=97.5 pct	256	172 (67.2)	1.00	-	88 (34.4)	1.00	-
	>97.5 pct	48	43 (89.6)	3.60 (1.31, 9.89)	0.0131	14 (29.2)	0.85 (0.39, 1.83)	0.675
60	TCA <=97.5 pct	222	154 (69.4)	1.00	-	52 (23.4)	1.00	-
	>97.5 pct	82	61 (74.4)	1.17 (0.57, 2.40)	0.670	50 (61.0)	7.54 (3.65, 15.60)	<0.0001

Factores de ajuste: sexo, edad, BMI, consumo de alcohol, fármacos terapéuticos para lesión hepática (agente antiviral, agente de protección hepática, formulación de ácidos biliares, formulación de aminoácidos, fármaco mejorador de hipalbuminemia, y formulación de vitamina K), y complicaciones (dislipidemia, diabetes, ictericia obstructiva, y cálculo renal)

Se encontró que los factores significativamente asociados con el tipo lesión hepatocelular son LCA (OR=2.06, P=0.0140), UDCA (OR=0.31, P=0.0112), y colágeno tipo IV (OR=2.19, P=0.0357). Los niveles de LCA y colágeno tipo IV mostraron una tendencia a ser altos y el nivel de UDCA mostró una tendencia a ser bajo (Tabla 4). Los niveles de CDCA (OR=0.50, P=0.0950), que tenía una relación isomérica con UDCA, y CA (OR=0.75, P=0.4702), que también era un ácido biliar primario, mostraron una tendencia a ser bajos, aunque su asociación con el tipo lesión hepatocelular era débil (Figura 3). Cuando los conjugados de taurina y los conjugados de glicina de los ácidos biliares se tomaron en consideración, los niveles de TCDCA (OR=2.31, P=0.0152), GDCA (OR=7.34, P=0.0017), TDCA (OR=3.60, P=0.0131), GLCA (OR=2.17, P=0.0195), y TLCA (OR=4.68, P=0.0003) mostraron una tendencia a ser significativamente altos y el nivel de GUDCA (OR=0.16, P=0.0009) mostró una tendencia a ser significativamente bajo.

Mientras tanto, se encontró que los factores significativamente asociados con el tipo colestasis son LCA (OR=0.29, P<0.0001), DCA (OR=0.26, P=0.0010), SSBA (OR=5.05, P<0.0001), colágeno tipo IV (OR=3.54, P=0.0015), HA (OR=3.66, P=0.0024), y ROS (OR=2.68, P=0.0010). Los niveles de LCA y DCA mostraron una tendencia a ser bajos y los niveles de otros factores diferentes de LCA y DCA mostraron una tendencia a ser altos (Tabla 4). Mientras tanto, se encontró que los niveles de CDCA (OR=1.98, P=0.0991), UDCA (OR=1.69, P=0.2353), y CA (OR=1.36, P=0.4269) mostraron una tendencia a ser altos, aunque su asociación con el tipo colestasis era débil. Es decir, se mostraron resultados contrastantes para el tipo lesión hepatocelular (Figura 4). Cuando los conjugados de taurina y los conjugados de glicina de ácidos biliares se tomaron en consideración, los niveles de GCDCA (OR=4.25, P<0.0001), TCDCA (OR=3.32, P=0.0002), GCA (OR=6.11, P<0.0001), TCA (OR=7.54, P<0.0001), y TUDCA (OR=3.20, P=0.0221) demostraron una tendencia a ser significativamente altos y el nivel de GDCA (OR=0.35, P=0.0182) mostró una tendencia a ser bajo. Se encontró que el nivel de colágeno tipo IV, que era un indicador de fibrosis hepática, también mostró una tendencia a ser alto en el tipo colestasis de manera similar al tipo lesión hepatocelular.

Se encontró que en los biomarcadores asociados con los síntomas de lesión hepática, los valores de corte que pueden usarse como referencias para la determinación de un tipo de lesión hepática se calculan a partir de las muestras séricas de pacientes sin la aplicación de un fármaco terapéutico para lesión hepática, y los resultados se muestran en la Tabla 2-1 y la Tabla 2-2. Los valores de corte de los biomarcadores para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular se muestran en la Tabla 2-1. Los valores de corte de los biomarcadores para identificar la lesión hepática de tipo colestasis se muestran en la Tabla 2-2.

Cuando se comparan los resultados del análisis multivariable entre el tipo lesión hepatocelular y el tipo colestasis, se encontró que LCA aumenta en el tipo lesión hepatocelular, y por el contrario, disminuye en el tipo colestasis. A partir de los resultados, se sugirió que LCA era un marcador útil para la discriminación de los síntomas de lesión hepática. Puede considerarse que en el tipo lesión hepatocelular, LCA, que era un ácido biliar secundario, mostró un valor alto. Con este aumento del metabolismo, UDCA, que es un isómero de CDCA que es un compuesto progenitor de LCA, mostró un valor bajo. Mientras tanto, puede considerarse que en el tipo colestasis, CDCA y CA, que eran ácidos biliares primarios,

mostraron una tendencia a aumentar debido a la colestasis, aunque su asociación con el tipo colestasis era débil. Con este aumento de nivel, la excreción de ácidos biliares al tracto gastrointestinal se suprimió, lo que da como resultado la disminución de los niveles de DCA y LCA. Además, en el tipo lesión hepatocelular, TCDCA, GDCA, TDCA, GLCA, y TLCA aumentaron significativamente, mientras que GUDCA disminuyeron significativamente, lo que puede considerarse como a continuación. Con un aumento significativo de LCA y un cambio en DCA que mostró una tendencia a aumentar pero sin importancia, también se potenció la producción de conjugados de estos. GUDCA mostró una tendencia a disminuir con una disminución de UDCA, pero TCDCA, que era un conjugado de taurina de CDCA, mostró una tendencia a aumentar. A partir de los resultados, se sugirió que en el tipo lesión hepatocelular, se aumentó el metabolismo de un ácido biliar primario a un ácido biliar secundario que tiene alta solubilidad en lípidos. Se encontró que en el tipo colestasis, GCDCA, TCDCA, GCA, TCA, y TUDCA aumentan significativamente, mientras que GDCA disminuye. A partir de los resultados, puede considerarse que ambas reacciones conjugadas de CDCA y CA aumentaron debido a la colestasis. Se ha informado que SSBA aumenta en enfermedades biliares (Literatura distinta de la de patentes 12). También en esta prueba, SSBA demostró un alto valor en el tipo colestasis, pero no se encontró un cambio significativo en SSBA en el tipo lesión hepatocelular.

Se encontró que los marcadores de fibrosis hepática medidos aumentan significativamente tanto en el tipo lesión hepatocelular como en el tipo colestasis. Entre los marcadores de estrés oxidativo medidos, 8-OHdG tendió a disminuir significativamente en el tipo lesión hepatocelular, pero el valor no cambió mucho en comparación con el de una población sana. El número de muestras de la población de pacientes que tenían un nivel de 8-OHdG mayor que el valor de corte era pequeño. Por lo tanto, la asociación de 8-OHdG con el tipo lesión hepatocelular no pudo determinarse claramente. Además, ROS, que era oxígeno reactivo, mostró un valor alto en el tipo colestasis, pero no se encontró un cambio significativo en ROS en el tipo lesión hepatocelular.

Los parámetros bioquímicos, que se han usado hasta ahora en el examen de enfermedades hepáticas, tienen correlaciones bajas con los biomarcadores medidos en este examen, y por lo tanto, es difícil discriminar con precisión los síntomas de lesión hepática solo con el uso de estos parámetros bioquímicos.

A partir de estos resultados, se sugirió que el nivel de LCA era específico para el tipo lesión hepatocelular y el tipo colestasis y mostró cambios significativos, y por lo tanto era útil como un marcador para discriminar los tipos de síntomas de lesión hepática. Además, los ácidos biliares primarios y SSBA también son eficaces para la determinación del tipo lesión hepatocelular, del tipo colestasis, y un tipo mixto de estos como marcadores que pueden ayudar a la discriminación de los tipos de síntomas de lesión hepática mediante el uso del nivel de LCA.

#### Aplicabilidad Industrial

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un método de prueba para discriminar un tipo de lesión hepática. La presente invención permite el diagnóstico temprano y la determinación temprana de una estrategia terapéutica de un tipo de lesión hepática en base a los síntomas clínicos, específicamente, tipo lesión hepatocelular, tipo colestasis, y un tipo mixto de estos. Como se describió anteriormente, la presente invención es extremadamente útil en el campo del examen de enfermedades hepáticas.

## Reivindicaciones

- 5 1. Un método de prueba para discriminar un tipo de una lesión hepática, que comprende medir un nivel de ácido litocólico, que en lo adelante se abrevia como LCA, en una muestra biológica recolectada de un sujeto para usar el nivel de LCA como un indicador
- 10 el método de prueba comprende además:  
determinar el tipo de lesión hepática como tipo de lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular
- 15 o  
determinar el tipo de lesión hepática como de tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis
- o  
determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto de tipo lesión hepatocelular y del tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.
- 20 2. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:  
medir cualquiera o ambos niveles de ácido ursodesoxicólico, abreviado en lo adelante como UDCA, y de colágeno tipo IV, para usar como indicadores cualquiera o ambos niveles de UDCA y de colágeno tipo IV además del nivel de LCA; y
- 25 determinar el tipo de lesión hepática como un tipo lesión hepatocelular cuando el nivel medido de LCA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel medido de UDCA y/o de colágeno tipo IV satisface cualquiera de los siguientes:  
(1) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular;
- 30 (2) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular; y  
(3) el nivel de UDCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular.
- 35 3. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:  
medir uno o más de los niveles de ácido desoxicólico, abreviado en lo adelante como DCA, ácido biliar sulfatado sérico, abreviado en lo adelante como SSBA, colágeno tipo IV, ácido hialurónico, abreviado en lo adelante como HA, y especies reactivas de oxígeno, abreviados en lo adelante como como ROS, para usar como indicadores los niveles de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS además del nivel de LCA; y
- 40 determinar el tipo de lesión hepática como de tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y los niveles medidos de DCA, SSBA, colágeno tipo IV, HA, y ROS satisfacen cualquiera o dos o más de los siguientes:  
(4) el nivel de DCA es igual a o menor que un valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;
- 45 (5) el nivel de SSBA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;  
(6) el nivel de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis;
- 50 (7) el nivel de HA es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis; y  
(8) el nivel de ROS es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.
- 55 4. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:  
medir un nivel de colágeno tipo IV, para usar como un indicador el nivel de colágeno tipo IV además del nivel de LCA; y
- 60 determinar el tipo de lesión hepática como un tipo mixto del tipo lesión hepatocelular y de tipo colestasis cuando el nivel medido de LCA es mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular y es menor que un valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis y cuando el nivel medido de colágeno tipo IV es igual a o mayor que un valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis.

65

5. El método de prueba de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el valor de corte predeterminado del nivel de LCA se calcula a partir de una curva característica operativa del receptor, que de aquí en adelante se denomina curva ROC, del nivel de LCA.
- 5 6. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 1, 2, o 4, en donde el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular se calcula a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular.
- 10 7. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 1, 3, o 4, en donde el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis se calcula a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo colestasis.
- 15 8. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, el valor de corte predeterminado del nivel de UDCA para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, y el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo lesión hepatocelular se calculan a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, una curva ROC predeterminada del nivel de UDCA para lesión hepática de tipo lesión hepatocelular, y una curva ROC predeterminada del nivel de colágeno tipo IV para enfermedad hepática de tipo lesión hepatocelular, respectivamente.
- 20 9. El método de prueba de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el valor de corte predeterminado del nivel de LCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de DCA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de SSBA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de colágeno tipo IV para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, el valor de corte predeterminado del nivel de HA para identificar la lesión hepática de tipo colestasis, y el valor de corte predeterminado del nivel de ROS para identificar la lesión hepática de tipo colestasis se calculan a partir de una curva ROC predeterminada del nivel de LCA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de DCA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de SSBA para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de colágeno tipo IV para lesión hepática de tipo colestasis, una curva ROC predeterminada del nivel de HA para lesión hepática de tipo colestasis, y una curva ROC predeterminada del nivel de ROS para lesión hepática de tipo colestasis, respectivamente.
- 25 30 35 10. El método de prueba de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra biológica es una muestra sanguínea.
- 40 11. El método de prueba de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la muestra biológica es una muestra sérica.
- 45 50 55 60 65 12. Un método de selección de un agente terapéutico para lesión hepática de acuerdo con un tipo de lesión hepática, en donde el método se aplica a un sujeto cuyo tipo de lesión hepática se determina mediante el método de prueba de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Figura 1

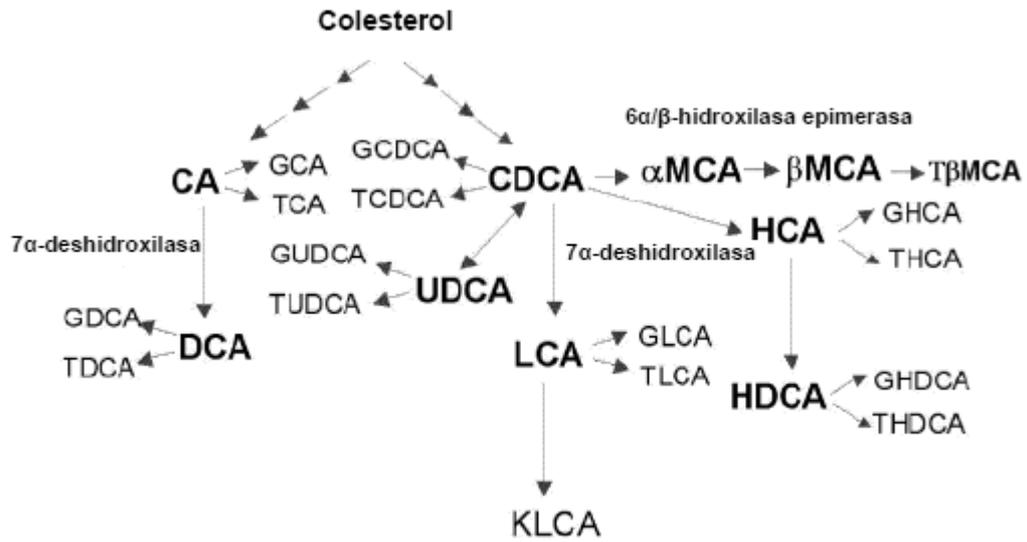


Figura 2

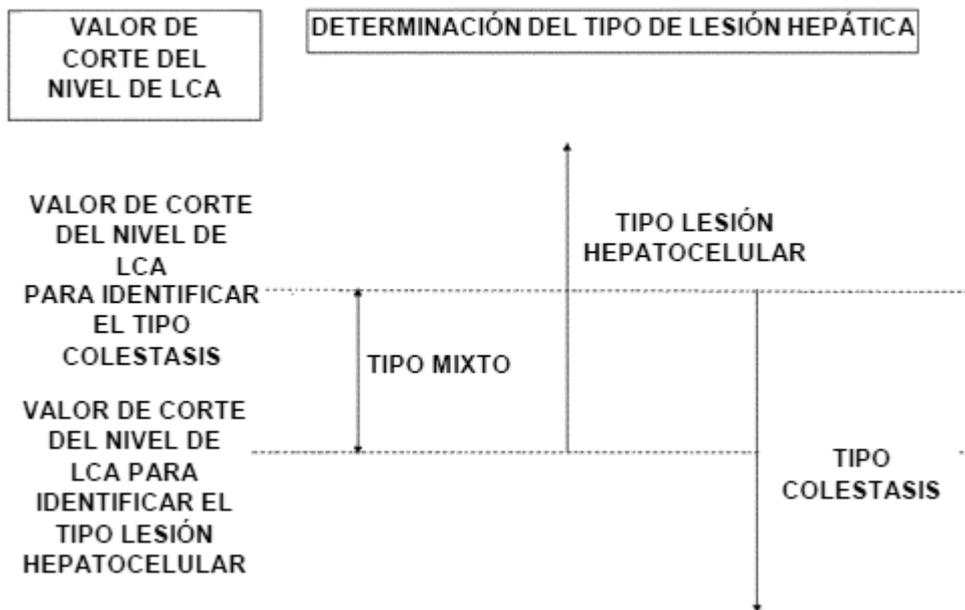


Figura 3

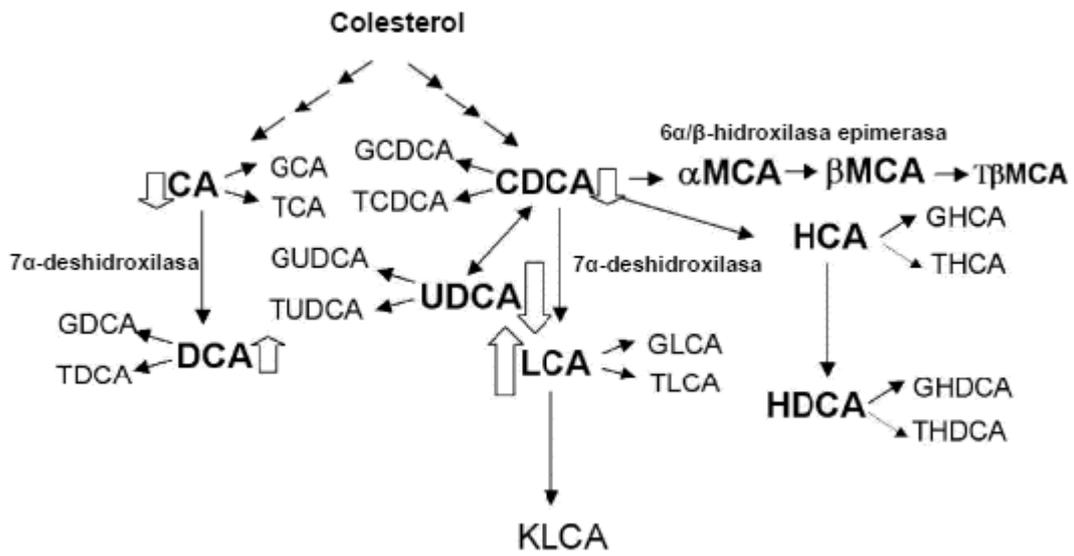


Figura 4

