

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 071**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2006 PCT/US2006/012253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2006 WO06107846**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 06749137 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 1874958**

54 Título: **Biomarcadores de lesiones hepáticas**

30 Prioridad:

01.04.2005 US 668121 P

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

20.11.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**SVETLOV, STANISLAV;
HAYES, RONALD, L.;
WANG, KEVIN K.W.;
OLI, MONIKA y
OTTENS, ANDREW, K.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 732 071 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

Biomarcadores de lesiones hepáticas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un panel de biomarcadores y métodos para el diagnóstico de lesiones hepáticas. En particular, se proporcionan la detección e identificación sensible, específica y fiable de biomarcadores que se producen únicamente en la lesión hepática.

Antecedentes

10 El hígado es un órgano extremadamente importante. Como el principal órgano metabólico del cuerpo, el hígado interviene en casi todos los procesos bioquímicos, incluida la desaminación de los aminoácidos y la formación de urea, la regulación del azúcar en sangre a través de la formación de glucógeno, la producción de proteínas plasmáticas, la producción y secreción de bilis, fagocitosis de material particulado de la circulación esplácnica (intestinal) y la desintoxicación y eliminación de toxinas tanto endógenas como exógenas.

15 Las múltiples funciones del hígado dependen de su asociación íntima con la sangre circulante. Cada célula hepática está expuesta en al menos una cara a una sinusoides de la sangre que contiene sangre arterial oxigenada mezclada con sangre venosa de la circulación esplácnica. Este profuso suministro de sangre es necesario para que el hígado funcione. La sangre de los sinusoides suministra a los hepatocitos oxígeno y nutrientes. Los hepatocitos usan los nutrientes tanto para sus propias necesidades metabólicas como para la síntesis de los muchos productos esenciales del hígado. Las anomalías en la sangre o la vasculatura pueden tener efectos inmediatos y graves en el hígado. Por ejemplo, las células hepáticas están expuestas a altas concentraciones de cualquier compuesto tóxico que se ingiere oralmente, tal como el alcohol etílico. Incluso cuando el compuesto ingerido no es tóxico en sí, los derivados intermedios producidos durante el metabolismo hepático del compuesto pueden dañar a los hepatocitos. Este fenómeno ocurre, por ejemplo, en la intoxicación por tetracloruro de carbono. Como la sangre se mueve lentamente a través de los sinusoides hepáticos, las células hepáticas también son muy vulnerables a los agentes infecciosos transmitidos por la sangre, como los virus y las bacterias. Además, los trastornos en la presión arterial hepática pueden dañar al tejido hepático. La insuficiencia cardíaca del lado derecho aumenta la presión arterial hepática y puede conducir a necrosis por presión (muerte hepatocelular) y fibrosis. La insuficiencia cardíaca del lado izquierdo puede reducir la perfusión hepática y conducir a la anoxia hepatocelular y la muerte.

20 El daño hepático de cualquier fuente puede dar como resultado regeneración hepática, necrosis (muerte celular), degeneración, inflamación, fibrosis o mezclas de estos procesos, dependiendo del tipo y el alcance de la lesión y su ubicación dentro del hígado. El hígado tiene grandes reservas funcionales, pero con una lesión progresiva, la alteración de la función hepática puede tener consecuencias potencialmente mortales. La cirrosis, que es un tipo de enfermedad hepática en etapa terminal, es una de las diez causas principales de muerte en el mundo occidental.

25 Existen algunos marcadores de lesión hepática (p. ej., ALT, LDH), que se han usado para el diagnóstico o el control de afecciones clínicas donde la lesión hepática, tal como la isquemia/reperfusión, es una de las principales causas patógenas del daño hepático. Estas afecciones son lesiones traumáticas y térmicas, cirugía abdominal, *shock* hemorrágico y séptico, heridas de bala abdominales y trasplante de hígado. Sin embargo, ALT, LDH y otros marcadores clásicos no son sensibles o no son específicos.

30 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de detección específica, sensible y fiable de biomarcadores que sean diagnósticos de lesión y enfermedad hepática.

40 Compendio

Se proporcionan marcadores nuevos, sensibles y específicos para el diagnóstico y control de lesiones múltiples inducidas por isquemia hepática. En particular, la identificación de biomarcadores se basa en la identificación de varias enzimas del ciclo de arginina/urea/óxido nítrico, enzimas de sulfuración y productos relacionados con la degradación de la espectrina. Estas incluyen, sin limitación, argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoil-fosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1 y proteína regulada por glucosa (GRP).

En una realización preferida, una composición comprende enzimas del ciclo de arginina/urea/óxido nítrico, enzimas de sulfuración y productos relacionados con la degradación de la espectrina.

50 En otra realización preferida, la composición comprende argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoil-fosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina.

En otra realización preferida, un método para detectar lesión isquémica hepática comprende la detección de una o más enzimas del ciclo de arginina, urea y/u óxido nítrico.

5 En otra realización preferida, un método para detectar lesión isquémica hepática comprende la detección de al menos un marcador de lesión hepática que comprende: argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoilfosfato sintetasa (CPS-I), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de la degradación de la espectrina.

10 En otra realización preferida, se proporcionan kits para la detección de lesión hepática. Preferiblemente, los kits proporcionan una composición de biomarcadores que comprenden al menos uno de los siguientes marcadores: argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoil-fosfato sintetasa (CPS-I), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de la degradación de la espectrina.

15 En otra realización preferida, el daño hepático de cualquier origen puede diagnosticarse y controlarse mediante la detección de uno o más biomarcadores descritos en la presente memoria y junto con otras pruebas conocidas, como la valoración del flujo sanguíneo hepático o el tiempo de coagulación de la protrombina, o marcadores séricos, tales como bilirrubina sérica, transaminasa sérica y niveles de fosfatasa alcalina sérica. El nivel de biomarcadores detectado se puede correlacionar con la evaluación histológica del tejido hepático, que es útil para determinar el tipo y el alcance del daño hepático; pruebas bioquímicas *in vitro* que miden la función hepática o los marcadores séricos o los resultados de la biopsia de tejido hepático. Si se desea, la detección de los biomarcadores se puede combinar con pruebas bioquímicas, biopsia de tejido, historia clínica del paciente y la valoración de los medios que inducen daño hepático se usa para determinar el alcance del daño hepático.

20 En otra realización preferida, las estrategias terapéuticas están dirigidas a fijar como objetivo la argininosuccinato sintetasa (ASS) y la argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST)).

Otros aspectos de la invención se describen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

25 La invención se señala con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas anteriores y adicionales de esta invención se pueden entender mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos que se adjuntan, en los cuales:

La figura 1 es una ilustración esquemática de las rutas que conducen a la apoptosis y necrosis después de la isquemia/reperfusión.

30 La figura 2 es un resultado de transferencia que muestra la expresión de ASS y sus fragmentos de escisión en hígado normal e I/R. Isquemia 30/10 - 30 min, reperfusión 10 min; 30/30 - 30 min isquemia, 30 min reperfusión.

35 Las figuras 3A a 3B son una serie de resultados de transferencias que muestran los niveles hepáticos de all-espectrina (A), argininosuccinato sintasa (B) y γ -GTP (C) intactos, isquemia/reperfusión e hígado intacto tratado *in vitro* con caspasa-3 o calpaína-2. La figura 3A muestra la detección de α -espectrina. La figura 3B muestra la detección de argininosuccinato sintetasa (ASS). La figura 3C muestra la detección de γ GTP.

La figura 4A muestra una tinción electroquimioluminiscente (ECL) en donde se detecta ASS en plasma. La figura 4B muestra una ASS detectora de fosfatasa alcalina en plasma. Ale - tratamiento del alcoholismo crónico en ratas. I/R - isquemia/reperfusión hepática. S - ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta. C - control (ratas normales). M - marcadores de peso molecular.

40 La figura 5 es un resultado de transferencia que muestra la detección del biomarcador ASS en el plasma de ratas con lesión hepática. Las lesiones hepáticas incluidas en los experimentos fueron: Alc - tratamiento del alcoholismo crónico en ratas. I/R - isquemia/reperfusión hepática. Los controles fueron: S - ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta. N - ratas intactas, sin tratamiento. (ratas normales). RC1 - control alto de sacarosa Alc. Marcadores de peso molecular M.

45 La figura 6 es un resultado de transferencia que muestra el curso del tiempo de reperfusión de la acumulación de ASS en plasma y suero de rata después de 30 minutos de isquemia.

La figura 7 es un resultado de transferencia que muestra la detección de EST-1 en el hígado, suero y plasma después de 30 minutos de isquemia.

50 La figura 8 es un resultado de transferencia que muestra la detección de la glutatión-S-transferasa en plasma de rata, usando métodos de detección de ECL. Las lesiones hepáticas incluidas en los experimentos fueron: Alc - tratamiento del alcoholismo crónico en ratas. I/R - isquemia/reperfusión hepática. Los controles fueron: S - ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta. N - ratas intactas, sin tratamiento. (ratas normales). RC1 - control alto de sacarosa Alc. M - marcadores de peso molecular.

La figura 9 es un resultado de transferencia que muestra la detección de γ -GTP en plasma de rata, usando

métodos de detección de ECL. Las lesiones hepáticas incluidas en los experimentos fueron: Alc - tratamiento del alcoholismo crónico en ratas. I/R - isquemia/reperfusión hepática. Los controles fueron: S - ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta. N - ratas intactas, sin tratamiento. (ratas normales). RC1 - control alto de sacarosa Alc. Marcadores de peso molecular M.

5 La figura 10 es un resultado de transferencia que muestra la detección de ALT en plasma de rata, usando métodos de detección de ECL. Las lesiones hepáticas incluidas en los experimentos fueron: Alc - tratamiento del alcoholismo crónico en ratas. I/R - isquemia/reperfusión hepática. Los controles fueron: S - ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta. N - ratas intactas, sin tratamiento. (ratas normales). RC1 - control alto de sacarosa Alc. Marcadores de peso molecular M.

10 Las figuras 11A-11D son escaneos de inmunotransferencias que muestran inmunotransferencia de alto rendimiento (HTPI, en inglés) de muestras hepáticas usando una matriz personalizada minirrejilla de 40 anticuerpos. El tejido hepático obtenido de cuatro ratas en cada grupo experimental se agrupó y procesó como se describe en Materiales y métodos en detalle. La figura 11A muestra los hígados de rata de control; la figura 11B muestra hígados de rata sometidos a 30 minutos de isquemia normotérmica seguida de 30 minutos de reperfusión (I/R, 30/30); las figuras 11C y 11D muestran hígados de rata de control tratados con caspasa-3 recombinante (figura 11C) o calpaína-2 (figura 11D) *in vitro*. Se muestra un resultado de transferencia representativo de 2 series de muestras idénticas. Los cuadrados rojos representan proteínas reguladas hacia arriba o hacia abajo en hígados tratados con I/R, caspasa-3 y calpaína-2 frente al control. Los números indican los números de carril en la transferencia. Carriles marcados: # Sintasa de óxido nítrico-2 (nNOS); # 8-arginasa-I; # 9-escualeno sintasa (SQS); # 12-β-catenina; # 13-a-actinina; # 16-MEK5; # 27-ASS; # 31-Ninjurin.

15 La figura 12 muestra la visualización de SDS-PAGE diferencial de las fracciones de proteínas recogidas después de la cromatografía de intercambio catiónico-aniónico (CAX) combinado. Las fracciones de CAX obtenidas de las muestras de control (C) e I/R (T) se emparejaron y se cargaron lado a lado en SDS-PAGE. Las proteínas con expresión diferencial se cuantificaron usando el software Phoretix 1D. Los números representan el número de fracción de control (C) o muestra I/R, respectivamente. Se muestran porciones de dos geles que contienen fracciones del 1 al 15. Las casillas marcadas representan proteínas visualizadas diferencialmente ya identificadas por RPLC-MSMS. Las identidades de proteínas determinadas por RPLC-MSMS se nombran al lado de cada casilla. Las casilla sin marcar muestran proteínas para ser identificadas.

20 La figura 13A muestra una inmunotransferencia de tipo Western de un panel de tejido de rata G1 N1+N2 sondado con anticuerpo ASS MAb, separado en un intervalo de 10 % a 20 %. Carril 1 - Cerebro; Carril 2- Diafragma; Carril 3- Corazón; Carril 4- Riñón; Carril 5- Hígado; Carril 6- Pulmón; Carril 7- Músculo esquelético; Carril 8- Piel; Carril 9- Bazo; Carril 10- Testículos. Transferencia de tipo Western examinada con ASS (BD#611700) Mab. La figura 13B muestra una inmunotransferencia de tipo Western de un panel de tejido de rata sondado con anticuerpo ASS2 PAb (conejo) separado en un intervalo de 10 % a 20 %. Carril 1- Cerebro; Carril 2- Diafragma; Carril 3- Corazón; Carril 4- Riñón; Carril 5- Hígado; Carril 6- Pulmón; Carril 7- Músculo esquelético; Carril 8- Piel; Carril 9- Bazo; Carril 10- Testículos.

25 La figura 14 es una transferencia de tipo Western de un panel de tejido de rata que muestra EST-1 sondado con anticuerpo de ratón. Carril 1: Cerebro; Carril 2: Diafragma; Carril 3: Corazón; Carril 4: Riñón; Carril 5: Hígado; Carril 6: Pulmón; Carril 7: Esqueleto; Carril 8: Piel; Carril 9: Bazo; Carril 10: Testículos.

30 La figura 15 es una transferencia de tipo Western que muestra el panel de tejido humano parcial ASS, 2 microgramos de proteína/carril; BD anticuerpo monoclonal ASS.

35 Las figuras 16A-16D son transferencias de tipo Western que muestran la expresión hepática de la espectrina total del citoesqueleto, las proteínas marcadoras específicas del hígado y sus productos de degradación después de la lesión de isquemia/reperfusión hepática. Las muestras de hígado se obtuvieron de animales intactos, de control (operados de forma simulada) o ratas sometidas a isquemia hepática (VR) de 30 minutos, seguida de reperfusión de 10 y 30 minutos. Los lisados de tejido hepático intacto se trataron *in vitro* con caspasa-3 recombinante o calpaína-2 (figura 16A) como se describe en Materiales y métodos. Las proteínas hepáticas (25 µg) se analizaron por SDS-PAGE/transferencia de tipo Western con anticuerpos contra la αII-espectrina no eritroide (figura 16A), argininosuccinato sintasa (figura 16B), arginasa-I (figura 16C) y sulfotransferasa de estrógeno (figura 16D) y visualizado usando ECL. Figura 16A: acumulación de productos de la degradación de αII-espectrina en hígados I/R similares a los fragmentos de escisión dependientes de caspasa-3 (120 kDa) y calpaína-2 (145 kDa); figura 16B: aparición de fragmentos de escisión de ASS dependientes de caspasa-3 dentro de los 10 minutos después de la reperfusión; figuras 16C y 16D: niveles hepáticos de arginasa-I y EST-1 después de 10 y 30 minutos de reperfusión. Se muestran imágenes representativas de transferencia de tipo Western de 3 tratamientos diferentes de caspasa-3 y calpaína-2 de tejidos hepáticos intactos combinados (figura 16A) y de 4 ratas experimentales en cada grupo de lesiones de I/R.

40 La figura 17 es una transferencia de tipo Western que muestra γGTP en el tejido hepático de I/R y ratas

normales y tejido normal hepático tratado con caspasa-3 y calpaína-2.

Las figuras 18A y 18B son transferencias de tipo Western que muestran la acumulación de biomarcadores de lesión hepática en sangre después de isquemia/reperfusión hepática, enfermedad alcohólica crónica y lesión hepática endotóxica aguda. Figura 18A: se extrajo sangre del corazón de rata después de 30 minutos de isquemia seguido de 30 de reperfusión y de ratas alcohólicas crónicas como se describe en los procedimientos experimentales. Figura 18B: las ratas se trataron con LPS/D-galactosamina o solución salina como se describe en Materiales y métodos. Se recogió suero o plasma y se procesaron volúmenes iguales (10 µl) como se describe en Materiales y métodos en detalle. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos contra ASS, EST-1 o alanina aminotransferasa ALT. Las membranas fueron desarrolladas por ECL y las imágenes fueron escaneadas. Se muestran transferencias representativas de 4 o 5 realizadas con al menos 3 experimentos diferentes (figura 18A). N - ratas intactas, sin tratamiento (N1, N2), ratas operadas de forma de simulada-S (S1, S2); isquemia I/R-30 min seguida de ratas de reperfusión de 30 min (I/R1, I/R2); A1, A2 y A3 - ratas alcohólicas crónicas (n=3). Los resultados de la transferencia representativa de 3 realizadas se muestra para el tratamiento con LPS/D-Gal usando 3 ratas para cada instante de tiempo; la muestra de I/R (30/30) se incluyó para comparación (figura 18B).

Las figuras 19A-19D muestran transferencias de tipo Western (figuras 19A, 19B) y las gráficas (figuras 19C y 19D) muestran la acumulación de ASS y EST-1 en sangre dependiente del tiempo después de I/R en ratas. La sangre se extrajo del corazón de rata después de 30 min de isquemia seguida de diferentes tiempos de reperfusión como se describe en Procedimientos experimentales. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE/transferencia de tipo Western con anticuerpo contra ASS (figura 19A) y EST-1 (figura 19B). Las imágenes se capturaron y las bandas de proteínas se calcularon usando el software ImageJ (figuras 19C, 19D). Se muestran resultados de transferencias representativas de 5 realizadas con al menos 4 experimentos diferentes. Ratas N-intactas, sin tratamiento (n = 5), ratas operadas de forma simulada-S (n = 4); I/R-30 min isquemia seguida de un tiempo de 10 a 180 minutos de reperfusión (n = 4).

La figura 20 muestra una transferencia de tipo Western de isquemia parcial de 60 minutos/reperfusión de 24 horas con anticuerpo contra ASS.

La figura 21 es una representación esquemática del método usado en un ELISA de tipo sándwich.

Las figuras 22A-22B son gráficos que muestran la curva de calibración para la detección de rASS (figura 22A) y los niveles de ASS en suero determinados por SW ELISA en ratas sometidas a tratamiento con LPS/D-Gal (figura 22B).

Las figuras 23A-23B muestran los resultados de las muestras de suero I/R de rata sondadas con el anticuerpo ASS2. La figura 23A es una gráfica que muestra los resultados de un ELISA de tipo sándwich (SW-ELISA). El anticuerpo de captura es el ASS2 de conejo; el anticuerpo de detección es el ASS2 de ratón (BD-biotrasducción). El ensayo se realizó en una placa de 384 pocillos, en un volumen de 20 µl/pocillo. La figura 23B es una inmunotransferencia de tipo Western. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 5 µl/pocillo y se sondó con anticuerpo ASS2 anticonejo (1 : 1000).

La figura 24 es una transferencia de tipo Western de datos primarios de trasplante humano. P # es paciente #; B- referencia (antes de la cirugía), A- estado ahepático; 3', 30', 60', 120' - minutos después de la reperfusión del hígado trasplantado.

La figura 25 es una gráfica que muestra la detección de ASS en pacientes.

La figura 26 es una gráfica que muestra los resultados de un ELISA de tipo sándwich. Muestras ASS de UF (paciente 1-4). Anticuerpo de captura: ASS-conejo 1000 ng/pocillo; proteína ASS: 100 ng/1^{er} pocillo; muestra de suero: 100 µl; detección Ab: 1 : 500 (BD-ratón).

La figura 27 es una gráfica que muestra los resultados de un ELISA de tipo sándwich (SW-ELISA) con una muestra de suero ASS (paciente 5-6).

La figura 28 es un gráfico que muestra los resultados de la detección de SDBP a partir de un ELISA de tipo sándwich usando muestras de hígado.

La figura 29 es un gráfico que muestra los valores séricos de ASS de seis pacientes de trasplante de hígado. Se recogieron muestras de suero de pacientes con trasplante de hígado (n = 6) antes de que se produjera el trasplante (referencia), mientras que se retiró el hígado (ahepático) y en varios instantes de tiempo después de insertar el nuevo hígado en los pacientes (1 min o 3 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min). Los niveles de ASS sérico se midieron mediante ELISA SW ASS específico (en ng/ml). Los valores de 150 ng/ml excedieron la sensibilidad del ensayo.

Descripción detallada

Se proporciona un panel de biomarcadores sensibles y específicos para diagnóstico de lesión hepática. En particular, se muestra que ASS, ASL, SQS y EST son biomarcadores patológicamente relevantes de la lesión inducida por isquemia/reperusión hepática. En estos estudios, se empleó el enfoque proteómico del hígado para el descubrimiento inicial de nuevos biomarcadores de lesión de isquemia/reperusión hepática. ASS, ASL, SQS y EST aparecen en plasma y suero en una etapa muy temprana de la lesión hepática inducida por isquemia/reperusión experimental, y por lo tanto tienen un alto valor diagnóstico y pronóstico, incluyendo el control del trasplante de hígado.

Definiciones

Antes de exponer la invención, puede ser útil para comprender la misma exponer definiciones de ciertos términos que se usan más adelante.

La expresión «lesión hepática» se usa en la presente memoria en el sentido más amplio e indica cualquier lesión hepática estructural o funcional que resulte, directa o indirectamente, de factores internos o externos o sus combinaciones. La lesión hepática puede ser inducida por una serie de factores que incluyen, sin que esta enumeración sea limitante, isquemia, exposición a compuestos hepatotóxicos, exposición a radiación, lesiones hepáticas mecánicas, predisposición genética, infecciones víricas, abuso de alcohol y drogas, enfermedades autoinmunitarias, tales como hepatitis crónica autoinmunitaria y como resultado de los niveles elevados de proteínas *in vivo*, tales como activina y TGF- β . El término «lesión hepática» incluye el rechazo de un hígado trasplantado.

El término «prevención», como se usa en el contexto de la presente invención, incluye el bloqueo completo o parcial de la aparición del daño hepático anticipado y la interceptación o moderación del progreso del daño hepático que ya ocurrió. Si bien se prevé que el daño hepático existente puede revertirse total o parcialmente, este no es un requisito según esta definición.

El término «cantidad preventivamente efectiva» se usa para designar una cantidad efectiva para lograr la prevención como se definió anteriormente.

Los pacientes con «riesgo de desarrollar daño hepático» incluyen aquellos pacientes que se anticipa que estén expuestos o que hayan estado expuestos a cualquier factor que se sepa que puede inducir daño hepático. Esto incluye la exposición a compuestos hepatotóxicos (ya sea como parte de una terapia o debido a una exposición accidental), en dosis consideradas convencionalmente seguras o en dosis convencionalmente consideradas inseguras, radiación o cualquier terapia clínica útil en el tratamiento de una enfermedad, en donde dicha terapia clínica se sabe que induce daño hepático. La definición incluye además una lesión hepática sostenida real o potencial a través de un traumatismo físico que incluye traumatismo cerrado, heridas de bala o cirugía. Los pacientes con riesgo de desarrollar daño hepático incluyen aquellos pacientes que tienen errores innatos del metabolismo y que están genéticamente predispuestos a la inducción de daño hepático, o aquellos pacientes de mamíferos susceptibles de daño hepático debido a otros factores de riesgo, incluidos factores genéticos, edad, sexo, estado nutricional, exposición a otras drogas y enfermedades sistémicas. Los pacientes con riesgo de desarrollar daño hepático también incluyen aquellos pacientes que se anticipa que estén expuestos o que hayan estado expuestos a virus tales como los de las hepatitis A, B, C, D o E o la hepatitis crónica autoinmunitaria.

La «isquemia» ocurre cuando se reduce o interrumpe el suministro de sangre oxigenada a un tejido.

«Marcador» o «biomarcador» se usan de manera intercambiable en la presente memoria y en el contexto de la presente invención se refieren a un polipéptido (de un peso molecular aparente particular) que está presente de manera diferente en una muestra tomada de pacientes con lesión hepática o trastornos hepáticos en comparación con una muestra comparable tomada de sujetos de control (por ejemplo, una persona con un diagnóstico negativo, un sujeto normal o sano).

La «actividad» de una enzima es la cantidad de producto producido por unidad de tiempo a una temperatura y pH fijos.

La «actividad específica» de una enzima es la cantidad de producto producido por unidad de tiempo por miligramo de proteína.

«Sustrato» es la proteína diana que la enzima cataliza. La Unión Internacional de Bioquímica (IUB) inició estándares de nomenclatura de enzimas que recomiendan que los nombres de enzimas indiquen tanto el sustrato sobre el que se actuó como el tipo de reacción catalizada.

«Complementario» en el contexto de la presente invención se refiere a la detección de al menos dos biomarcadores, que cuando se detectan juntos proporcionan mayores sensibilidad y especificidad en comparación con la detección de un biomarcador solo.

La expresión «presente diferencialmente» se refiere a las diferencias en la cantidad o la frecuencia de un marcador presente en una muestra tomada de pacientes que tienen, por ejemplo, una lesión hepática en comparación con un sujeto de control. Por ejemplo, un marcador puede ser un polipéptido que está presente a un nivel elevado o a un nivel

disminuido en muestras de pacientes con lesión hepática en comparación con muestras de sujetos de control. Alternativamente, un marcador puede ser un polipéptido que se detecta a una frecuencia más alta o más baja en muestras de pacientes en comparación con muestras de sujetos de control. Un marcador puede estar presente diferencialmente en términos de cantidad, frecuencia o ambos.

- 5 Un polipéptido está presente diferencialmente entre las dos muestras si la cantidad del polipéptido en una muestra es estadísticamente significativamente diferente de la cantidad del polipéptido en la otra muestra. Por ejemplo, un polipéptido está presente diferencialmente entre las dos muestras si está presente al menos aproximadamente el 120 %, al menos aproximadamente el 130 %, al menos aproximadamente el 150 %, al menos aproximadamente el 180 %, al menos aproximadamente el 200 %, al menos aproximadamente el 300 %, al menos aproximadamente el 500 %, al menos aproximadamente el 700 %, al menos aproximadamente el 900 % o al menos aproximadamente el 1000 % más de lo que está presente en la otra muestra o si es detectable en una muestra y no detectable en la otra.

- 10 Alternativamente o adicionalmente, un polipéptido está presente diferencialmente entre los dos conjuntos de muestras si la frecuencia de detección del polipéptido en muestras de pacientes con lesión hepática o trastornos hepáticos es estadísticamente significativamente mayor o menor que en las muestras de control. Por ejemplo, un polipéptido está presente diferencialmente entre los dos conjuntos de muestras si se detecta al menos aproximadamente el 120%, al menos aproximadamente el 130%, al menos aproximadamente el 150%, al menos aproximadamente el 180%, al menos aproximadamente el 200%, al menos aproximadamente el 300%, al menos aproximadamente el 500%, al menos aproximadamente el 700%, al menos aproximadamente el 900% o al menos aproximadamente el 1000% más frecuentemente o menos frecuentemente observado en un conjunto de muestras que el otro conjunto de muestras.

- 15 «Diagnóstico» significa identificar la presencia o la naturaleza de un proceso patológico. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La «sensibilidad» de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de «verdaderos positivos»). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son «falsos negativos». Los sujetos que no están enfermos y que tienen un resultado negativo en el ensayo, se denominan «verdaderos negativos». La «especificidad» de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de «falsos positivos» se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dieron positivo. Si bien un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

- 20 Una «cantidad de prueba» de un marcador se refiere a la cantidad de un marcador presente en una muestra que se está probando. Una cantidad de prueba puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, µg/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, la intensidad relativa de las señales).

- 25 Una «cantidad diagnóstica» de un marcador se refiere a una cantidad de un marcador en la muestra de un sujeto que es consistente con un diagnóstico de lesión hepática o trastorno hepático. Una cantidad de diagnóstico puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, µg/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, intensidad relativa de las señales).

- 30 Una «cantidad de control» de un marcador puede ser cualquier cantidad o un intervalo de cantidad que debe compararse con una cantidad de prueba de un marcador. Por ejemplo, una cantidad de control de un marcador puede ser la cantidad de un marcador en una persona sin lesión hepática o trastorno hepático. Una cantidad de control puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, µg/ml) o una cantidad relativa (por ejemplo, intensidad relativa de las señales).

- 35 «Sonda» se refiere a un dispositivo que se puede insertar de manera extraíble en un espectrómetro de iones en fase gaseosa y comprende un sustrato que tiene una superficie para presentar un marcador para la detección. Una sonda puede comprender un único sustrato o una pluralidad de sustratos.

- 40 «Sustrato» o «sustrato de sonda» se refiere a una fase sólida sobre la cual se puede proporcionar un adsorbente (por ejemplo, por unión, deposición, etc.).

- 45 «Adsorbente» se refiere a cualquier material capaz de adsorber un marcador. El término «adsorbente» se usa en la presente memoria para referirse tanto a un solo material («adsorbente monoplex») (por ejemplo, un compuesto o grupo funcional) al que está expuesto el marcador como a una pluralidad de materiales diferentes («adsorbente múltiple») a la que se expone el marcador. Los materiales adsorbentes en un adsorbente múltiple se refieren como «especies adsorbentes». Por ejemplo, una ubicación accesible en un sustrato de sonda puede comprender un adsorbente múltiple caracterizado por muchas especies adsorbentes diferentes (por ejemplo, materiales de intercambio aniónico, quelantes de metales o anticuerpos), que tienen diferentes características de unión. El material del sustrato en sí también puede contribuir a adsorber un marcador y puede considerarse parte de un «adsorbente».

- 50 «Adsorción» o «retención» se refiere a la unión detectable entre un adsorbente y un marcador, ya sea antes o después del lavado con un eluyente (modificador del umbral de selectividad) o una disolución de lavado.

- 55 «Eluyente» o «disolución de lavado» se refiere a un agente que se puede usar para mediar la adsorción de un marcador a un adsorbente. Los eluyentes y las disoluciones de lavado también se refieren como «modificadores del umbral de selectividad». Se pueden usar eluyentes y disoluciones de lavado para lavar y eliminar los materiales no unidos de la superficie del sustrato de la sonda.

- 5 «Resolver», «resolución» o «resolución de marcador» se refiere a la detección de al menos un marcador en una muestra. La resolución incluye la detección de una pluralidad de marcadores en una muestra por separación y posterior detección diferencial. La resolución no requiere la separación completa de uno o más marcadores de todas las demás biomoléculas en una mezcla. Más bien, cualquier separación que permita la distinción entre al menos un marcador y otras biomoléculas es suficiente.
- 10 «Espectrómetro de iones en fase gaseosa» se refiere a un aparato que mide un parámetro que puede traducirse en relaciones de masa a carga de iones formados cuando una muestra se volatiliza e ioniza. En general, los iones de interés tienen una sola carga y las relaciones de masa a carga a menudo se denominan simplemente masa. Los espectrómetros de iones en fase gaseosa incluyen, por ejemplo, espectrómetros de masas, espectrómetros de movilidad de iones y dispositivos de medición de la corriente de iones totales.
- «Espectrómetro de masas» se refiere a un espectrómetro de iones en fase gaseosa que incluye un sistema de entrada, una fuente de ionización, un conjunto de iones ópticos, un analizador de masas y un detector.
- «Espectrómetro de masas de desorción con láser» se refiere a un espectrómetro de masas que usa el láser como medio para desorber, volatilizar e ionizar un analito.
- 15 «Detectar» se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del objeto que se tiene que detectar.
- Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo o mimético de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales. Los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de residuos de carbohidratos para formar glucoproteínas. Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» incluyen glucoproteína, así como no glucoproteínas.
- 20 «Fracción detectable» o una «etiqueta» se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, las etiquetas útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , tintes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. La fracción detectable a menudo genera una señal medible, como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de fracción detectable unida en una muestra. La cuantificación de la señal se logra, por ejemplo, mediante recuento de centelleo, densitometría o citometría de flujo.
- 25 «Anticuerpo» se refiere a un ligando polipeptídico codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se unen específicamente y reconocen un epítipo (por ejemplo, un antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante de cadena ligera kappa y lambda, los genes de región constante de cadena pesada alfa, gamma, delta, épsilon y mu, y los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Esto incluye, por ejemplo, fragmentos Fab' y F(ab)'₂. El término «anticuerpo», como se usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. También incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos de cadena única. La porción «Fc» de un anticuerpo se refiere a la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de región constante de cadena pesada, CH₁, CH₂ y CH₃, pero no incluye la región variable de cadena pesada.
- 30 «Inmunoensayo» es un ensayo en que se usa un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un marcador). El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, captar o cuantificar el antígeno.
- 35 La expresión «se une específicamente (o selectivamente)» a un anticuerpo o «específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con», «cuando se refiere a una proteína o a un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales derivados del marcador argininosuccinato sintetasa (ASS) de especies específicas como ratas, ratones o seres humanos pueden seleccionarse para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con el marcador ASS y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas y alelos del marcador ASS. Esta selección se puede lograr restando los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con las moléculas ASS marcadoras de otras especies. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase,
- 50
- 55

por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, a Laboratory Manual (1988), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva es al menos dos veces la señal de fondo o el ruido y, más típicamente, más de 10 a 100 veces el fondo.

5 «Molécula de absorción de energía» o «EAM, en inglés» se refiere a una molécula que absorbe energía de una fuente de ionización en un espectrómetro de masas, ayudando así a la desorción del analito, como un marcador, de una superficie de sonda. Dependiendo del tamaño y la naturaleza del analito, la molécula que absorbe energía puede usarse opcionalmente. Las moléculas de absorción de energía usadas en MALDI se refieren frecuentemente como «matriz». Los derivados del ácido cinámico, ácido sinapínico («SPA»), ácido cianohidroxicinámico («CHCA») y ácido
10 dihidroxibenzoico se usan frecuentemente como moléculas de absorción de energía en la desorción con láser de moléculas bioorgánicas.

«Muestra» se usa en la presente memoria en su sentido más amplio. Una muestra que comprende polinucleótidos, polipéptidos, péptidos, fragmentos de anticuerpos y derivados de los mismos puede comprender un fluido corporal; una fracción soluble de una preparación celular o medio en el cual las células crecieron; un cromosoma, un orgánulo
15 o una membrana aislados o extraídos de una célula; ADN genómico, ARN o ADNc, polipéptidos o péptidos en disolución o unidos a un sustrato; una célula; un tejido; una impresión de tejido; una huella dactilar, piel o cabello; fragmentos y derivados de los mismos.

«Substancialmente purificado» se refiere a moléculas de ácido nucleico o proteínas que se eliminan de su entorno natural y se aíslan o se separan, y están al menos aproximadamente 60 % libres, preferiblemente aproximadamente
20 75 % libres y lo más preferiblemente aproximadamente 90 % libres, de otros componentes con los que están asociados de forma natural.

«Sustrato» se refiere a cualquier soporte rígido o semirrígido al que se unen moléculas de ácido nucleico o proteínas e incluye membranas, filtros, virutas, láminas, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, capilares u
25 otros tubos, placas, polímeros y micropartículas con una variedad de formas de superficie que incluyen pocillos, hoyos, alfileres, canales y poros.

Como se usa en la presente memoria, el término «fragmento o segmento», tal como se aplica a una secuencia de ácido nucleico, gen o polipéptido, generalmente será al menos aproximadamente 5 bases de ácido nucleico contiguos (para secuencia de ácido nucleico o gen) o aminoácidos (para polipéptidos), típicamente al menos aproximadamente
30 10 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, más típicamente al menos aproximadamente 20 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, generalmente al menos aproximadamente 30 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente 40 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 60 a 80 o más bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos en la longitud. Los «fragmentos superpuestos» como se usan en la presente memoria, se refieren a
35 fragmentos de ácido nucleico o péptido contiguos que comienzan en el extremo amino terminal de un ácido nucleico o proteína y terminan en el extremo carboxi terminal del ácido nucleico o proteína. Cada ácido nucleico o fragmento peptídico tiene al menos aproximadamente una posición de ácido nucleico o aminoácido contiguo en común con el siguiente ácido nucleico o fragmento peptídico, más preferiblemente al menos aproximadamente tres bases de ácido nucleico contiguo o posiciones de aminoácidos en común, lo más preferiblemente al menos aproximadamente diez
40 bases de ácido nucleico contiguos en posiciones de aminoácidos en común.

Un «fragmento» significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos 20 nucleótidos, más generalmente al menos 23 nucleótidos, normalmente al menos 26 nucleótidos, más normalmente al menos 29 nucleótidos, a menudo al menos 32 nucleótidos, más a menudo al menos 35 nucleótidos, típicamente al menos 38 nucleótidos, más típicamente al menos 41 nucleótidos, usualmente al menos 44 nucleótidos, más usualmente al menos 47 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos 53 nucleótidos y en realizaciones particularmente preferidas es al menos 56 o más nucleótidos.

Como se usa en la presente memoria, los términos «polipéptido» o «péptido» engloban cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas las proteínas de longitud completa citadas en la presente memoria.

50 Como se usa en la presente memoria, «péptidos o epítomos con secuencias amino más largas» abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas las proteínas de longitud completa citadas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, «variante» o «derivado» de polipéptidos se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más residuos de aminoácidos. La variante puede tener cambios «conservativos», en donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (por ejemplo, reemplazo de leucina con isoleucina). Más raramente, una variante puede tener cambios «no conservativos» (por ejemplo, reemplazo de glicina con triptófano). Las variaciones menores análogas también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos o ambas. La guía para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin suprimir la actividad biológica se puede encontrar usando programas

informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, el software LASERGENE (DNASTAR).

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán una identidad de aminoácidos significativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden abarcar «polimorfismos de nucleótido único» (los SNP) o mutaciones de base única en las que la secuencia de polinucleótido varía en una base.

«Rigurosidad» significa la combinación de condiciones a las que se someten los ácidos nucleicos que causan la disociación del dúplex, como la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de aditivos tales como la formamida. Las condiciones que tienen más probabilidades de causar la disociación del dúplex se denominan «mayor rigor», por ejemplo, mayor temperatura, menor fuerza iónica y mayor concentración de formamida.

Para aplicaciones que requieren alta selectividad, uno deseará típicamente emplear condiciones relativamente estrictas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán condiciones relativamente bajas de sal o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C.

Para ciertas aplicaciones, se aprecia que se requieren condiciones de rigurosidad más bajas. En estas condiciones, la hibridación puede ocurrir aunque las secuencias de la sonda y la cadena diana no sean perfectamente complementarias, pero no coincidan en una o más posiciones. Las condiciones pueden ser menos rigurosas al aumentar la concentración de sal y disminuir la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigurosidad media podría ser proporcionada por NaCl de aproximadamente 0,1 M a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras una condición de baja rigurosidad podría ser proporcionada por sal de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varíen desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. Por lo tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

La expresión «condiciones de hibridación» y sus equivalentes gramaticales, cuando se usan con un período de tiempo de mantenimiento, indican someter la mezcla de reacción de hibridación, en el contexto de la concentración de los agentes reaccionantes y los reactivos que la acompañan en la mezcla, a tiempo, temperatura, condiciones de pH suficientes para permitir que la sonda polinucleotídica se alinee con la secuencia diana, típicamente para formar el dúplex de ácido nucleico. Tales condiciones de tiempo, temperatura y pH requeridas para lograr la hibridación dependen, como es conocido en la técnica de la longitud de la sonda polinucleotídica que se tiene que hibridar, el grado de complementariedad entre la sonda polinucleotídica y la diana, el contenido de guanidina y citosina del polinucleótido, la rigurosidad de la hibridación deseada y la presencia de sales o reactivos adicionales en la mezcla de reacción de hibridación, que pueden afectar a la cinética de la hibridación. Los métodos para optimizar las condiciones de hibridación para una mezcla de reacción de hibridación dada son conocidos en la técnica.

Biomarcadores hepáticos

En una realización preferida, la detección de una o más enzimas del ciclo de arginina/urea/óxido nítrico, enzimas de sulfuración y productos relacionados con la degradación de la espectrina es diagnóstico de lesión hepática. Los ejemplos de estos marcadores incluyen, sin limitación: argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), sintetasa de carbamoil fosfato (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina.

En otra realización preferida, la detección de uno o más biomarcadores puede correlacionarse con pruebas de diagnóstico conocidas de lesión hepática. Los ejemplos incluyen: pruebas de función hepática - valoración del aclaramiento hepático de aniones orgánicos, como bilirrubina, verde de indocianina (ICG), sulfobromoftaleína (BSP) y ácidos biliares; valoración del flujo sanguíneo hepático mediante mediciones de galactosa y aclaramiento de ICG y valoración de la función microsomal hepática, mediante el uso de la prueba de aliento con aminopirina y la prueba de aclaramiento de la cafeína.

En una realización preferida, la detección de los biomarcadores es un diagnóstico de lesión hepática. La lesión hepática es el resultado de cualquier factor. Por ejemplo, lesión isquémica hepática; daño hepático inducido por compuestos hepatotóxicos, que incluye la citotoxicidad directa, que incluye reacciones de hipersensibilidad a fármacos, colestasis y lesión del endotelio vascular (Sinclair et al., Textbook of Internal Medicine, 569-575 (1992) (editor, Kelley; Editor, J. B. Lippincott Co.).

Una serie de compuestos hepatotóxicos, incluidas ciertas terapias, inducen la citotoxicidad. Los compuestos hepatotóxicos pueden producir citotoxicidad hepática por ataque químico directo o por la producción de un metabolito tóxico. Aunque el mecanismo exacto de la hepatotoxicidad es incierto, los productos del metabolismo reductivo son especies altamente reactivas que se unen a las macromoléculas celulares y causan la peroxidación lipídica y la inactivación de la metabolización de fármacos y otras enzimas. La lesión de la membrana provoca la liberación de calcio de las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso y parece interferir con la bomba de iones calcio, que normalmente previene la acumulación citosólica de calcio. El efecto perjudicial sobre el metabolismo celular con la acumulación de calcio resultante, la pérdida de potasio y enzimas del citoplasma y la pérdida de energía esencial que

resulta de la lesión mitocondrial contribuyen a la necrosis del tejido hepático.

Muchos compuestos hepatotóxicos producen de manera impredecible daño hepático en una pequeña proporción de los receptores. En algunos pacientes, el daño hepático se refiere como una reacción de hipersensibilidad y es como el de una reacción farmacológica, donde el paciente presenta fiebre, erupción y eosinofilia y tiene una recurrencia de los síntomas al volver a tomar el fármaco. En otras situaciones, el mecanismo para la lesión es desconocido y puede representar un metabolismo anormal en pacientes susceptibles que permite la producción o acumulación de metabolitos hepatotóxicos.

Entre los fármacos que inducen citotoxicidad por ataque químico directo se incluyen los siguientes: anestésicos, tales como, éflurano, fluroxeno, halotano y metoxiflurano; neuropsicotrópicos, tales como, cocaína, hidrazidas, metilfenidato y tricíclicos; anticonvulsivos, tales como fenitoína y ácido valproico; analgésicos, tales como acetaminofeno, clorzoxazona, dantrólono, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, salicilatos, tolmetina y zoxazolamina; hormonas, tales como, acetoexamida, carbutamida, glipizida, metaexamida, propiltiouracilo, tamoxifeno, dietilestilbestrol; antimicrobianos, tales como, anfotericina B, clindamicina, ketoconazol, mebendazol, metronidazol, oxacilina, ácido paraaminosalicílico, penicilina, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclina y zidovudina; fármacos cardiovasculares, tales como amiodarona, diltiazem, metildopa-a, mexiletina, hidrazalina, ácido nicotínico, papaverina, perhexilina, procainamida, quinidina y tocain-amida e inmunosupresores y antineoplásicos, tales como asparaginasa, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, doxorubicina, fluorouracilo, metotrexato, mitramicina, 6-MP, nitrosoureas, tamoxifeno, tioguanina y vincristina y fármacos diversos, tales como, disulfiram, ión yoduro, oxifenisatina, vitamina A y ácido paraaminobenzoico.

Los compuestos hepatotóxicos que producen reacción de hipersensibilidad en el hígado incluyen los siguientes: fenitoína, ácido paraaminosalicílico, clorpromazina, sulfonamidas, estolato de eritromicina, isoniazida, halotano, metildopa y ácido valproico.

Los compuestos hepatotóxicos que inducen colestasis, una detención en el flujo de la bilis, pueden tomar varias formas. La colestasis centribular se acompaña de cambios inflamatorios de la entrada. Se han informado cambios en los conductos biliares con algunos fármacos como la eritromicina, mientras que la colestasis canalicular pura es característica de otros fármacos como los esteroides anabólicos. La colestasis crónica se ha relacionado con fármacos como la metiltestosterona y el estradiol.

Entre los compuestos hepatotóxicos que inducen enfermedades colestásicas se incluyen los siguientes: esteroides anticonceptivos, esteroides androgénicos, esteroides anabólicos, ácido acetilsalicílico, azatioprina, benzodiazepina, ácido chenodesoxicólico, clordiazepóxido, estolato de eritromicina, flufenazina, furosemida, griseofulvina, haloperidol, imipramina, 6-mercaptopurina, metimazol, metotrexato, metildopa, metilendiamina, metiltestosterona, naproxeno, nitrofurantoina, penicilamina, perfenazina, proclorperazina, promazina, tiabendazol, tioridazina, tolbutamida, trimetoprimulfametoxazol, arsénico, cobre y paraquat.

Algunos fármacos, aunque son principalmente colestásicos, también pueden producir hepatotoxicidad y, por lo tanto, la lesión hepática que causan es mixta. Los fármacos que causan una lesión hepática mixta incluyen, por ejemplo, los siguientes: clorpromazina, fenilbutazona, halotano, clordiazepóxido, diazepam, alopurinol, fenobarbital, naproxeno, propiltiouracilo, cloranfenicol, trimetoprimulfametoxazol, amrinona, disopiramida, azatioprina, cimetidina y ranitidina.

Los fármacos pueden producir lesiones vasculares del hígado, que incluyen trombosis de las venas hepáticas, oclusión de las vénulas hepáticas o enfermedad venooclusiva (VOD, en inglés) y hepatitis por peliosis. Además, pueden producirse lesiones que incluyen dilatación sinusoidal, fibrosis perisinusoidal y esclerosis hepatoportal. La dilatación sinusoidal central y pericentral se informó por primera vez como una complicación de la terapia anticonceptiva oral. La hepatitis por peliosis es una afección que consiste en grandes cavidades llenas de sangre que resultan de la filtración de glóbulos rojos a través de la barrera endotelial, seguida de fibrosis perisinusoidal. Se ha descrito en pacientes que toman anticonceptivos orales, esteroides anabólicos, azatioprina y danazol. También se sabe que la lesión y la oclusión de las vénulas hepáticas centrales están relacionadas con la ingestión de alcaloides de pirrolizidina, como los téis de arbusto. La lesión inicial es una necrosis central acompañada de una disminución progresiva del calibre de las vénulas. Todas estas lesiones pueden ser solo parcialmente reversibles cuando se suspende el fármaco y puede desarrollarse cirrosis.

Varios tipos de neoplasias hepáticas benignas y malignas pueden resultar de la administración de compuestos hepatotóxicos. Los adenomas, una lesión restringida a las mujeres en edad fértil, están relacionados con el uso de esteroides anticonceptivos y el riesgo aumenta con la duración de su uso. El carcinoma hepatocelular también se puede observar en pacientes que toman hormonas androgénicas para la anemia aplásica o el hipopituitarismo.

Los compuestos hepatotóxicos que se sabe que causan lesiones hepáticas incluyen los siguientes: esteroides anticonceptivos, alcaloides de pirrolizidina, uretano, azatioprina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, mitomicina, BCNU, vincristina, adriamicina, vitamina E intravenosa, esteroides anabolicandrogénicos, azatioprina, acetato de medroxiprogesterona, sulfato de estrona, tamoxifeno, arsénicos inorgánicos, dióxido de torio, vitamina A, metotrexato, clorhidrato de metilamfetamina, vitamina A, corticosteroides, dióxido de torio y radioterapia.

El daño hepático causado por otros factores generalmente toma formas similares. El daño hepático, ya sea causado

por la hepatotoxicidad de un compuesto, radioterapia, predisposición genética, lesión mecánica o cualquier combinación de tales factores y otros, puede ser detectado por los biomarcadores descritos en la presente memoria.

En otras realizaciones preferidas, la detección de biomarcadores como diagnóstico de lesión hepática, tal como lesión debida a isquemia, puede correlacionarse con pruebas existentes. Estas pueden incluir, sin que esta enumeración sea limitante, fosfatasa alcalina (AP); 5'- nucleotidasa (5'-ND) y α -glutamil transpeptidasa (G-GT); leucina aminopeptidasa (LAP); aspartato transaminasa (AST); alanina transaminasa (ALT); fructosa-1,6-difosfato aldolasa (ALD); lactato deshidrogenasa (LDH); isocitrato deshidrogenasa (ICDH); ornitina-carbamoyltransferasa (OCT) y sorbitol deshidrogenasa (SDH) arginasa; guanasa; creatina fosfocinasa (CPK); colinesterasa (ChE); niveles de péptido procolágeno tipo III (PIIIP); niveles de amoníaco en la sangre en las hepatoencefalopatías; ligando en niveles de necrosis y hepatoma; niveles de hialuronato debido al daño de las células endoteliales hepáticas; los niveles de α -1-fetoproteína (AFP) para detectar el hepatoma; los niveles de antígeno carcinoembrionario (CEA) para detectar metástasis de cáncer en el hígado; elevaciones de anticuerpos contra una variedad de componentes celulares, tales como proteínas de membrana hepática mitocondrial, nuclear y específica y la detección de proteínas, tales como albúmina, globina, aminoácidos, colesterol y otros lípidos. Además, el análisis bioquímico de una variedad de minerales, metabolitos y enzimas obtenidos a partir de biopsias hepáticas puede ser útil para identificar biomarcadores adicionales en trastornos hepáticos heredados, adquiridos e inducidos experimentalmente.

En otras realizaciones, la cantidad de biomarcadores detectados se puede correlacionar con las pruebas de función hepática para valorar aún más la lesión hepática. Las pruebas de función hepática incluyen lo siguiente: valoración del aclaramiento hepático de aniones orgánicos, como bilirrubina, verde de indocianina (ICG), sulfobromoftaleína (BSP) y ácidos biliares; valoración del flujo sanguíneo hepático mediante mediciones de galactosa y aclaramiento de ICG y valoración de la función microsomal hepática, mediante el uso de la prueba de aliento con aminopirina y la prueba de aclaramiento de cafeína. Por ejemplo, la bilirrubina sérica se puede medir para confirmar la presencia y la gravedad de la ictericia y para determinar el grado de hiperbilirrubinemia, como se observa en la enfermedad hepática parenquimatosa. Las elevaciones de la aminotransferasa (transaminasa) reflejan la gravedad del daño hepatocelular activo, mientras que las elevaciones de fosfatasa alcalina se encuentran con colestasis e infiltrados hepáticos (Isselbacher, K. y Podolsky, D. en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12ª edición. Wilson et al. eds., 2: 1301-1308 (1991)).

Inmunoensayos

Los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de los biomarcadores hepáticos (p. ej., argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoyl-fosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina) se pueden usar, como se explica en la presente invención, para detectar y diagnosticar lesiones hepáticas. También se pueden usar eficazmente diversos métodos de tinción histológica, incluyendo métodos de tinción inmunohistoquímica, según las explicaciones de la invención.

Un método de detección para determinar si una muestra contiene, por ejemplo, proteínas de argininosuccinato liasa (ASL), péptidos o fragmentos de las mismas, comprende, por ejemplo, inmunoensayos que emplean radioinmunoensayos (RIA) o metodologías de ensayo inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), basados en la producción de anticuerpos específicos (monoclonales o policlonales) contra la proteína ASL. Se puede usar cualquier muestra, sin embargo, las muestras preferidas que comprenden los biomarcadores hepáticos son sangre, suero, plasma. La venopunción (sangre), la orina y otras secreciones corporales, como el sudor y las lágrimas, también pueden usarse como muestras biológicas. Por ejemplo, en una forma de RIA, la sustancia de prueba se mezcla con antisuero diluido en presencia de antígeno radiomarcado. En este método, la concentración de la sustancia de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo específico y se relaciona directamente con la cantidad de antígeno marcado libre. Otros métodos de determinación adecuados son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

La presente invención también se refiere a métodos para detectar proteínas biomarcadoras hepáticas o fragmentos de las mismas, en una muestra o sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para la proteína ASL, o un fragmento de la misma, pueden marcarse de manera detectable con cualquier marcador apropiado, por ejemplo, un radioisótopo, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta paramagnética o un radical libre.

Los métodos para fabricar y detectar tales anticuerpos marcados de forma detectable o sus derivados funcionales son bien conocidos por los expertos en la técnica. El término «anticuerpo» se refiere tanto a anticuerpos monoclonales, que son una población sustancialmente homogénea como a anticuerpos policlonales, que son poblaciones heterogéneas. Los anticuerpos policlonales derivan de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. Los anticuerpos monoclonales (los MAb) para antígenos específicos pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4,376,110. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. Se aprecia que Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden usar para la detección y cuantificación de, por ejemplo, proteínas ASL, péptidos o fragmentos de los mismos, según los métodos descritos en la presente memoria con el fin de detectar y diagnosticar la enfermedad hepática de la misma manera que un anticuerpo intacto. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, usando enzimas como

la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Se dice que un anticuerpo es «capaz de unirse» a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para así unir la molécula al anticuerpo. El término «epítopo» significa la porción de cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo que también puede ser reconocido por ese anticuerpo. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

Un «antígeno» es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo que además es capaz de inducir a un animal a producir un anticuerpo capaz de unirse a un epítopo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítopo. La reacción específica referida anteriormente indica que el antígeno reaccionará, de manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos. Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención se pueden usar para detectar cuantitativamente o cualitativamente los biomarcadores hepáticos o se pueden usar en tinciones histológicas para detectar la presencia de células que contienen, por ejemplo, proteínas ASL y fragmentos de antígenos. Por lo tanto, los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden emplearse histológicamente para detectar o visualizar la presencia de argininosuccinato sintetasa (ASS) y arginino-succinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoilfosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos.

Dicho ensayo para detectar biomarcadores hepáticos, típicamente comprende incubar una muestra biológica de un sujeto sospechoso de tener tal condición en presencia de una molécula de unión marcada de manera detectable (por ejemplo, un anticuerpo) capaz de identificar un biomarcador y detectar la molécula de unión que está unida en una muestra

Por lo tanto, en este aspecto de la invención, una muestra biológica puede tratarse con nitrocelulosa u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte se puede lavar después con tampones adecuados seguido de un tratamiento con la etiqueta detectable, por ejemplo, con un anticuerpo específico anti-ASL. El soporte en fase sólida puede después lavarse con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida en dicho soporte sólido puede entonces detectarse por medios convencionales. Por «soporte en fase sólida» se entiende cualquier soporte capaz de unirse a antígenos o anticuerpos. Los soportes bien conocidos o vehículos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una cuenta, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, como una lámina, una tira de prueba, etc. Los soportes preferidos incluyen cuentas de poliestireno. Los expertos en la técnica observarán muchos otros portadores adecuados para unirse al anticuerpo monoclonal o antígeno, o pueden determinar el mismo mediante el uso de la experimentación rutinaria.

Una realización para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico de la presente invención en una muestra biológica que contiene biomarcadores hepáticos, comprende poner en contacto un anticuerpo marcado de forma detectable específico para un biomarcador deseado. Para fines ilustrativos, ASL se usa como un ejemplo no limitativo. Un anticuerpo específico anti-ASL marcado de forma detectable está unido a un soporte sólido para efectuar la inmovilización de un anticuerpo específico anti-ASL; poner en contacto con una muestra sospechosa de contener ASL o fragmentos de la misma en dicho soporte sólido; incubar el anticuerpo específico anti-ASL marcado de manera detectable con el soporte durante un tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo específico anti-ASL inmovilizado se una a ASL y fragmentos de la misma. Estas etapas van seguidas del lavado y la detección de la etiqueta unida y, por lo tanto, la detección y cuantificación de ASL y fragmentos de la misma.

Alternativamente, el anticuerpo anti-ASL específico marcado o los complejos de proteína ASL en una muestra pueden separarse de una mezcla de reacción poniendo en contacto el complejo con un anticuerpo o proteína inmovilizados que sea específico para una inmunoglobulina, por ejemplo, proteína de estafilococo A, proteína de estafilococo G, anticuerpos anti-IgM o anti-IgG. Dichos anticuerpos antiinmunoglobulina pueden ser policlonales o preferiblemente monoclonales. El soporte sólido se puede lavar después con un tampón adecuado para dar un complejo de anticuerpo específico inmovilizado ASL/marcado anti-ASL. La etiqueta puede ser detectada después para dar una medida de la proteína ASL. Las concentraciones específicas de anticuerpos y ASL marcados de manera detectable, la temperatura y el tiempo de incubación, así como otras condiciones de ensayo, pueden variar, dependiendo de varios factores que incluyen la concentración de proteína en la muestra, la naturaleza de la muestra y similares. La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-ASL se puede determinar según métodos conocidos. Los expertos en la técnica son capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando la experimentación rutinaria. Otras etapas tales como lavado, mezclado, agitación, filtración y similares pueden añadirse a los ensayos como es habitual o necesario para la situación particular.

- Una de las formas en que el anticuerpo específico anti-ASL se puede marcar de forma detectable es vincularlo a una enzima. Esta enzima, a su vez, cuando se exponga más tarde a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera que produzca un resto químico que pueda detectarse, por ejemplo, por espectrofotometría, fluorometría o por medios visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de manera detectable el anticuerpo específico anti-ASL incluyen, sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa δ -V-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.
- La detección se puede realizar usando cualquiera de una variedad de inmunoensayos. Por ejemplo, al marcar radiactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos anti-ASL, es posible detectar la proteína ASL o sus fragmentos, mediante el uso de radioinmunoensayos.
- El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como la utilización de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente invención son: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C y preferiblemente ^{125}I .
- También es deseable etiquetar el anticuerpo específico anti-ASL con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo etiquetado con fluorescencia se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, su presencia se puede detectar después debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de etiquetado fluorescentes más comúnmente usados se encuentran el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.
- El anticuerpo específico anti-ASL también se puede etiquetar de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo anti-ASL específico usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El anticuerpo específico anti-ASL también se puede etiquetar de forma detectable mediante su acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo específico anti-ASL marcado con quimioluminiscencia se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de etiquetado quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.
- El anticuerpo específico anti-ASL también se puede etiquetar con biotina y después reaccionar con avidina. Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para etiquetar el anticuerpo específico anti-ASL de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para fines de etiquetado son luciferina, luciferasa y aequorina.
- La detección del anticuerpo anti-ASL específico se puede lograr mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si la etiqueta detectable es un emisor de rayos gamma radioactivos, o por un fluorómetro, por ejemplo, si la etiqueta es un material fluorescente. En el caso de una etiqueta enzimática, la detección se puede realizar mediante métodos calorimétricos que empleen un sustrato para la enzima. La detección también se puede realizar mediante una comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.
- Para los fines de la presente invención, la proteína ASL o fragmentos de la misma, que se detectan mediante este ensayo pueden estar presentes en una muestra biológica. Se puede usar cualquier muestra que contenga una proteína ASL o fragmentos de la misma. Sin embargo, uno de los beneficios de la presente invención diagnóstica es que se puede evitar la eliminación invasiva de tejido. Por lo tanto, preferiblemente, la muestra es una disolución biológica tal como, por ejemplo, plasma, fluido amniótico, sangre, suero, orina y similares. Sin embargo, la invención no se limita a los ensayos que usan solo estas muestras, ya que es posible para un experto en la técnica determinar las condiciones adecuadas que permitan la utilización de otras muestras. Por lo tanto, el diagnóstico de lesión o enfermedad hepática se puede establecer mediante un inmunoensayo sanguíneo simple, no invasivo, que revele los niveles de proteína ASL o fragmentos de la misma, que se incrementan considerablemente con respecto a los niveles normales.
- Hay muchas etiquetas y métodos de etiquetado *in vivo* diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se pueden usar en la presente invención incluyen isótopos radiactivos e isótopos paramagnéticos. Los expertos en la técnica conocerán otras etiquetas adecuadas para unirse a los anticuerpos usados en la invención, o pueden determinarlos, usando la experimentación rutinaria. Además, la unión de estas etiquetas a los anticuerpos se puede realizar usando técnicas estándar comunes a los expertos en la técnica.
- Un factor importante en la selección de un radionúclido para el diagnóstico *in vivo* es que la vida media de un radionúclido sea lo suficientemente larga como para que aún sea detectable en el momento de la máxima captación por parte de la diana, pero lo suficientemente corta para que se minimice la radiación deletérea sobre el huésped. Idealmente, un radionúclido usado para imágenes *in vivo* carecerá de una emisión de partículas, pero producirá un gran número de fotones en el intervalo de 140 keV a 200 keV, que pueden detectarse fácilmente con las cámaras

gamma convencionales.

5 Para el diagnóstico *in vivo*, los radionúclidos pueden unirse al anticuerpo directa o indirectamente mediante la utilización de un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios que se usan a menudo en la unión de radioisótopos que existen como iones metálicos a las inmunoglobulinas son DTPA y EDTA. Ejemplos típicos de iones que pueden unirse a inmunoglobulinas son ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹²⁵I, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl.

10 Para las imágenes de diagnóstico *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante en la selección de un radionúclido dado. El radionúclido elegido debe tener un tipo de descomposición que sea detectable para un tipo dado de instrumento. En general, cualquier método convencional para visualizar imágenes de diagnóstico puede usarse según esta invención. Por ejemplo, los detectores PET, gamma, beta y MRI se pueden usar para visualizar la imagen de diagnóstico.

Los anticuerpos útiles en la invención también pueden etiquetarse con isótopos paramagnéticos para fines de diagnóstico *in vivo*. Los elementos que son particularmente útiles, como en la resonancia magnética (MRI), incluyen ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy y ⁵⁶Fe.

15 Los anticuerpos útiles en los presentes métodos también son particularmente adecuados para uso en inmunoensayos *in vitro* para detectar la presencia de una proteína ASL o fragmentos de la misma, en tejidos corporales, fluidos (como CSF, sangre, plasma o suero) o extractos celulares. En tales inmunoensayos, los anticuerpos pueden utilizarse en fase líquida o, preferiblemente, unidos a un vehículo de fase sólida, como se describió anteriormente.

20 Los expertos en la técnica conocerán otras etiquetas adecuadas que pueden emplearse según la presente invención. La unión de estas etiquetas a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede lograr usando técnicas estándar comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas de acoplamiento mencionadas en este último son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método del éster maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida.

25 La eliminación de una muestra histológica de un paciente y el suministro de la combinación de anticuerpos etiquetados de la presente invención a dicha muestra pueden lograr la detección *in situ*. El anticuerpo se proporciona preferiblemente aplicando o superponiendo el anticuerpo etiquetado a una muestra biológica. Mediante el uso de tal procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de la proteína ASL o fragmentos de la misma, sino también la distribución de la proteína ASL en el tejido examinado. Usando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden modificarse para lograr tal detección *in situ*.

30 Las moléculas de unión de la presente invención pueden adaptarse para su utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo de «dos sitios» o «sándwich». En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de anticuerpo no marcado (o fragmento de anticuerpo) se une a un soporte sólido que es insoluble en el fluido que se está analizando (es decir, sangre, plasma o suero) y se agrega una cantidad de anticuerpo soluble marcado de manera detectable para permitir la detección o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo en fase sólida, el antígeno y el anticuerpo marcado.

35 Los ensayos inmunométricos típicos incluyen ensayos «hacia adelante» en los que el anticuerpo unido a la fase sólida se pone en contacto por primera vez con la muestra que se está analizando para extraer el antígeno de la muestra mediante la formación de un anticuerpo binario en fase sólida - complejo de antígeno. Después de un período de incubación adecuado, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra de fluido, incluido el antígeno sin reaccionar, si corresponde, y después se pone en contacto con la disolución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo etiquetado (que funciona como una «molécula informadora»). Después de un segundo período de incubación para permitir que el anticuerpo etiquetado se compleje con el antígeno unido al soporte sólido a través del anticuerpo no etiquetado, el soporte sólido se lava una segunda vez para eliminar el anticuerpo etiquetado sin reaccionar. Este tipo de ensayo sándwich hacia adelante puede ser un simple ensayo «sí/no» para determinar si el antígeno está presente o puede hacerse cuantitativo comparando la medida del anticuerpo etiquetado con la obtenida para una muestra estándar que contiene cantidades conocidas de antígeno.

40 En otro tipo de ensayo «sándwich», que también puede ser útil con los antígenos de la presente invención, se usan los llamados ensayos «simultáneos» e «inversos». Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación, ya que el anticuerpo unido al soporte sólido y el anticuerpo etiquetado se añaden a la muestra que se está analizando al mismo tiempo. Una vez completada la incubación, el soporte sólido se lava para eliminar el residuo de la muestra de fluido y el anticuerpo marcado sin complejar. La presencia de un anticuerpo etiquetado asociado al soporte sólido se determina después como lo haría en un ensayo sándwich convencional «hacia adelante».

45 En el ensayo «inverso», se utiliza una primera adición por etapas de una disolución de anticuerpo etiquetado a la muestra de fluido, seguida de la adición de un anticuerpo no etiquetado unido a un soporte sólido después de un período de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, la fase sólida se lava de manera convencional para liberarla del residuo de la muestra que se está analizando y la disolución del anticuerpo etiquetado sin reaccionar. La determinación del anticuerpo etiquetado asociado a un soporte sólido se determina después como en los ensayos «simultáneos» y «hacia adelante».

Los métodos de detección *in vitro* o *in vivo* descritos anteriormente se pueden usar en la detección y en el diagnóstico de enfermedades hepáticas sin la necesidad de extraer tejido. Dichos métodos de detección se pueden usar para ayudar a determinar la etapa de deterioro hepático en la lesión o enfermedad hepática mediante la evaluación y comparación de la concentración de una proteína ASL o fragmentos de la misma, en la muestra biológica.

5 Usando los marcadores purificados o sus secuencias de ácidos nucleicos, los anticuerpos que se unen específicamente a un marcador pueden prepararse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Coligan, *Current protocols in immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies: a laboratory manual* (1988); Goding, *Monoclonal antibodies: principles and practice* (2ª ed. 1986) y Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975).
 10 Tales técnicas incluyen, sin limitación, la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science* 246: 1275-1281 (1989); Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989)).

Después de proporcionar el anticuerpo, se puede detectar o cuantificar un marcador usando cualquiera de los ensayos de unión inmunológica adecuados conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. números 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288 y 4,837,168). Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo enzimático (EIA) tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo radioinmunitario (RIA), un ensayo de transferencia de tipo Western o un ensayo de transferencia por ranura. Estos métodos también se describen, por ejemplo, en *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, Ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991) y Harlow & Lane, *supra*.

20 En general, una muestra obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto con el anticuerpo que se une específicamente al marcador. Opcionalmente, el anticuerpo puede fijarse a un soporte sólido para facilitar el lavado y el posterior aislamiento del complejo, antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación, una barra, una cuenta o una microcuenta. Los anticuerpos también pueden unirse a un sustrato de sonda o una matriz de chips de proteínas descrita anteriormente. La muestra es preferiblemente una muestra de fluido biológico tomada de un sujeto. Los ejemplos de muestras de fluido biológico incluyen sangre, suero, plasma, células hepáticas, tejidos, orina, lágrimas, saliva, etc. En una realización preferida, el fluido biológico comprende suero o plasma. La muestra se puede diluir con un eluyente adecuado antes de poner en contacto la muestra con el anticuerpo.

Después de incubar la muestra con anticuerpos, se lava la mezcla y se puede detectar el complejo marcador-anticuerpo formado. Esto se puede lograr incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Este reactivo de detección puede ser, por ejemplo, un segundo anticuerpo que está etiquetado con una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables ilustrativas incluyen cuentas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), tintes fluorescentes, radioetiquetas, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros comúnmente usados en un ELISA) y etiquetas colorimétricas como oro coloidal o vidrio coloreado o cuentas de plástico. Alternativamente, el marcador en la muestra puede detectarse usando un ensayo indirecto, en donde, por ejemplo, se usa un segundo anticuerpo etiquetado para detectar un anticuerpo unido a un marcador específico, o en un ensayo de competencia o inhibición en donde, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo distinto del marcador se incuba simultáneamente con la mezcla.

40 A lo largo de los ensayos, pueden requerirse etapas de incubación o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato del ensayo, el marcador, el volumen de la disolución, las concentraciones de los fragmentos y derivados de los mismos. Por lo general, los ensayos se realizan a temperatura normal, aunque se pueden realizar en un intervalo de temperaturas, tal como de 10 °C a 40 °C.

45 En una realización preferida, el inmunoensayo es un ELISA de tipo sándwich. Los inmunoensayos se pueden usar para determinar la presencia o ausencia de un marcador en una muestra, así como la cantidad de un marcador en una muestra. Primero, se puede detectar una cantidad de prueba de un marcador en una muestra usando los métodos de inmunoensayo descritos anteriormente. Si hay un marcador presente en la muestra, formará un complejo marcador-anticuerpo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador en las condiciones de incubación adecuadas descritas anteriormente. La cantidad de un complejo anticuerpo-marcador se puede determinar comparando con un estándar. Un estándar puede ser, por ejemplo, un compuesto conocido u otra proteína que se sabe que está presente en una muestra. Como se indicó anteriormente, no se necesita medir la cantidad de prueba del marcador en unidades absolutas, siempre que la unidad de medida se pueda comparar con un control.

55 Los métodos para detectar estos marcadores en una muestra tienen muchas aplicaciones. Por ejemplo, uno o más marcadores pueden medirse para ayudar en el diagnóstico de lesión hepática, enfermedad hepática, grado de lesión, abuso de alcohol y drogas, lesión fetal debida al abuso de alcohol o drogas por parte de madres embarazadas, etc. En otro ejemplo, los métodos para la detección de los marcadores pueden usarse para controlar las respuestas en un sujeto, al tratamiento. En otro ejemplo, los métodos para detectar marcadores pueden usarse para analizar e identificar compuestos que modulen la expresión de estos marcadores *in vivo* o *in vitro*.

Los datos generados por desorción y detección de marcadores pueden analizarse usando cualquier medio adecuado. En una realización, los datos se analizan con el uso de un ordenador digital programable. El programa de ordenador generalmente contiene un medio legible que almacena códigos. Se puede dedicar cierto código a la memoria que incluye la ubicación de cada característica en una sonda, la identidad del adsorbente en esa característica y las condiciones de elución usadas para lavar el adsorbente. El ordenador también contiene un código que recibe como entrada, datos sobre la intensidad de la señal en varias masas moleculares recibidas desde una ubicación particular en la sonda. Estos datos pueden indicar el número de marcadores detectados, incluida la intensidad de la señal generada por cada marcador.

El análisis de datos puede incluir las etapas para determinar la intensidad de la señal (p. ej., la altura de los picos) de un marcador detectado y eliminar «valores atípicos» (datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada). Los picos observados pueden normalizarse, un proceso mediante el cual se calcula la altura de cada pico en relación con alguna referencia. Por ejemplo, una referencia puede ser el ruido de fondo generado por un instrumento y sustancias químicas (por ejemplo, una molécula que absorbe energía) que se establece como cero en la escala. Después, la intensidad de la señal detectada para cada marcador u otras biomoléculas se puede mostrar en forma de intensidades relativas en la escala deseada (por ejemplo, 100). Alternativamente, se puede admitir un estándar (p. ej., proteína ASL) con la muestra, de modo que se pueda usar un pico del estándar como referencia para calcular las intensidades relativas de las señales observadas para cada marcador u otros marcadores detectados.

El ordenador puede transformar los datos resultantes en varios formatos para mostrar. En un formato, denominado «vista de espectro o mapa de retenido», se puede mostrar una vista espectral estándar, en donde la vista representa la cantidad de marcador que llega al detector en cada peso molecular en particular. En otro formato, referido como «mapa de picos», solo la información de altura y masa del pico se retiene de la vista del espectro, lo que proporciona una imagen más limpia y permite que los marcadores con pesos moleculares casi idénticos se puedan ver más fácilmente. En otro formato más, referido como «vista de gel», cada masa de la vista de pico se puede convertir en una imagen en escala de grises basada en la altura de cada pico, lo que da como resultado una apariencia similar a las bandas en geles electroforéticos. En otro formato más, referido como «superposiciones 3D», se pueden superponer varios espectros para estudiar los cambios sutiles en las alturas relativas de los picos. En otro formato más, referido como «vista de mapa de diferencia», se pueden comparar dos o más espectros, resaltando convenientemente los marcadores únicos y los marcadores que están regulados hacia arriba o hacia abajo entre las muestras. Los perfiles de marcadores (espectros) de cualquiera de las dos muestras pueden compararse visualmente. En otro formato más, se puede usar Spotfire Scatter Plot, en donde los marcadores que se detectan se representan como un punto en una gráfica, en donde un eje de la gráfica representa la masa molecular aparente de los marcadores detectados y otro eje representa la intensidad de la señal de los marcadores detectados. Para cada muestra, los marcadores que se detectan y la cantidad de marcadores presentes en la muestra se pueden guardar en un medio legible por ordenador. Estos datos pueden compararse después con un control (por ejemplo, un perfil o una cantidad de marcadores detectados en el control, por ejemplo, sujetos normales y sanos en los que la lesión hepática no es detectable).

Kits

El ensayo de la presente invención también es ideal para la preparación de un kit. Dicho kit puede comprender un medio portador que está compartimentado para recibir en confinamiento cercano con uno o más medios contenedores tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de dichos medios contenedores los elementos separados del inmunoensayo. Por ejemplo, puede haber un medio contenedor que contenga un primer anticuerpo inmovilizado en un soporte de fase sólida y un medio contenedor adicional que contenga un segundo anticuerpo etiquetado de forma detectable en disolución. Otros medios contenedores pueden contener disoluciones estándar que comprendan diluciones en serie de los biomarcadores hepáticos que se tengan que detectar. Las disoluciones estándar de cada biomarcador hepático se pueden usar para preparar una curva estándar con la concentración de cada biomarcador hepático representada en la abscisa y la señal de detección en la ordenada. Los resultados obtenidos a partir de una muestra que contenga cualquiera de los biomarcadores hepáticos pueden interpolarse a partir de dicha gráfica para obtener la concentración de cada biomarcador detectado.

En una realización, se proporciona un panel de biomarcadores en el kit. Estos biomarcadores incluyen, sin limitación: argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP) carbamoil-fosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina.

En otra realización, los anticuerpos dirigidos a un panel de biomarcadores de hígado se proporcionan en el kit. Los anticuerpos incluyen, sin limitación, anticuerpos específicos para argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), sintetasa de carbamoilfosfato, α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

El kit puede proporcionar tanto el panel de biomarcadores de hígado como los anticuerpos, si se desea. Por ejemplo, argininosuccinato sintetasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL), sulfuración (estrógeno sulfotransferasa (EST), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoil-fosfato sintetasa (CPS-1), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación. Si bien se han proporcionado ejemplos específicos, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva. Una o más de las características de las realizaciones descritas previamente pueden combinarse de cualquier manera con una o más características de cualquier otra realización en la presente invención. Además, muchas variaciones de la invención se hacen evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la memoria descriptiva. Por lo tanto, el alcance de la invención debe determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que debe determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas junto con su alcance completo de equivalentes.

Al citar varias referencias en la presente memoria, los solicitantes no admiten ninguna referencia particular como «técnica anterior» a su invención.

10 Ejemplos

Materiales y métodos

Modelo de rata de lesión por isquemia/reperfusión.

Las ratas Sprague Dawley macho adultas se anestesian con isoflurano al 4 % hasta que alcanzan un nivel quirúrgico de anestesia. Un cono nasal sigue suministrando los gases anestésicos. Se realiza una incisión en la línea media de aproximadamente 3 cm de longitud (laparotomía) y se expone el hígado. La vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar de los lóbulos lateral izquierdo y mediano están ocluidos por una pequeña pinza vascular. El suministro de sangre al lóbulo derecho no se interrumpe y el flujo sanguíneo portal se mantiene a través de ellos sin evidencia de congestión vascular del tracto alimentario. Después de 30 minutos de isquemia normotérmica, la recirculación de la sangre a través del hígado isquémico se logra retirando la pinza durante 30 minutos adicionales. Después del final de la reperfusión, la eutanasia de los animales se realiza mediante toracotomía bilateral, se recoge la sangre, el hígado se perfunde brevemente con PBS frío para eliminar la sangre residual y se toma para su análisis.

Procesamiento de tejido hepático y preparación de muestras.

Para el análisis de alto rendimiento - transferencia de tipo Western ((HTS-WB) (PowerBlot)) y análisis de transferencia de Western convencionales, las muestras hepáticas se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido después de la extracción. Las muestras de hígado de ratas I/R, sin tratamiento y operadas de manera simulada se homogeneizan en hielo usando Polytron en un tampón RIPA que consiste en PBS, 1 % de Nonidet P-40, 0,5 % de desoxicolato sódico, 0,1 % de SDS, DTT 1 mM, que contiene 0,1 mg/ml de PMSF, ortovanadato de sodio 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Roche, Inc). Para el tratamiento *in vitro* de r-caspasa-3 y r-calpaína-2, los hígados obtenidos de ratas intactas (sin tratamiento) se homogeneizan en un tampón RIPA que consiste en PBS, Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM sin inhibidores de proteasa. Los homogeneizados se dejan en hielo durante 30 minutos y se centrifugan durante 15 minutos a 1047 rad/s (10 000 rpm) a 4 ° C. Los sobrenadantes se eliminan y las proteínas se miden usando ácido bicineconíico (Pierce, Inc). Las muestras de hígado intactas se tratan *in vitro* con caspasa-3 (Chemicon, act. específica). 1 µg/(µl) o calpaína-2 (Calbiochem, 0,25 µg/µl).

35 Análisis de transferencia de tipo Western de alto rendimiento (HTS-WB) y transferencia de Western convencional.

El gel es 13 cm x 10 cm, gradiente de 4 % a 15 % de SDS-poliacrilamida, espesor de 0,5 mm (BioRad Criterion IPG), se cargan 200 µg de proteína en un pocillo grande en todo el ancho del gel. Esto se traduce en ~ 8 µg por carril en un minigel estándar de 10 pocillos. El gel se ejecuta durante 1,5 horas a 150 voltios, las proteínas se transfieren a la membrana Immobilon-P (Millipore). La membrana se bloquea durante una hora con tampón de bloqueo.

40 La membrana se sujeta con un colector de transferencia Western que aísla 40 canales a través de la membrana. En cada canal, se añade un cóctel complejo de anticuerpos y se hibrida durante una hora a 37 °C.

La transferencia se retira, se lava y se visualiza durante 30 minutos a 37 °C con un antirratón de cabra secundario conjugado con el colorante fluorescente Alexa680 (Molecular Probes). La membrana se lava, se seca y se escanea a 700 nm (para detección de dianas de anticuerpos monoclonales) usando el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey.

45 Estándares de MW: los carriles 4 y 40 de todas las transferencias se cargan con dos cócteles de estandarización. Análisis de datos - el análisis de datos incluye datos de intensidad de señal sin procesar y normalizados de cada transferencia con cambios mayores que 1,5 veces los indicados. A continuación se describen las características del análisis: 1. Cantidad - intensidad total de un punto definido. 2.

50 Cantidad normalizada - todas las transferencias se normalizan a la intensidad de la suma de todos los puntos válidos en una transferencia y después se multiplican por 1 000 000. 3/. Proporción: la cantidad normalizada para bandas experimentales expresada como una proporción de la cantidad normalizada para las bandas de control correspondientes. La proporción se usa para determinar los aumentos o disminuciones en la expresión de proteínas. Los resultados también se expresan como cambio de plegamiento, un valor semicuantitativo que representa la tendencia general de los cambios de proteínas, ya sea en aumento o en disminución, para la muestra experimental en relación con el control.

Los cambios se enumeran en orden de confianza, siendo el nivel 10 la confianza más alta. Los niveles de confianza se definen como: a) Nivel 10 - cambios mayores que 2 plegamientos en las 4 comparaciones de señales de buena calidad que también pasan una inspección visual; b) Nivel 9 - Cambios de 1,5 a 1,9 plegamientos en las 4 comparaciones de señales de buena calidad que también pasan una inspección visual; c) Nivel 8 - cambios superiores a 2 plegamientos en las 4 comparaciones de señales bajas que pasan una inspección visual; d) Nivel 7 - Cambios de 1,25 a 1,5 plegamientos en las 4 comparaciones de señales de buena calidad que pasan una inspección visual; e) Nivel 6 - cambios mayores a 2 plegamientos en las 4 comparaciones que no pasan la inspección visual; f) Nivel 5 - Cambios de 1,5 a 1,9 plegamientos en las 4 comparaciones que no pasan la inspección visual.

Análisis dirigido de proteínas específicas del hígado

- 10 El análisis que se muestra en la tabla 1, se realiza mediante transferencia de tipo Western usando un anticuerpo disponible a través de varias fuentes. Normalmente, se cargan 25 µg de proteína con dos conjuntos idénticos de 5 muestras, separadas en gel de minislabs de poliacrilamida entre 4 % y 20 % y se transfieren a la membrana de PVDF. La membrana se corta en 2 partes, se bloquea, se prueba con dos anticuerpos diferentes, se visualiza con el kit ECL Plus (Pierce, Inc) y se escanea. Las membranas se separan usando un tampón de separación y se vuelven a sondar con otros dos anticuerpos. Después de visualizar las bandas con el kit EDCL Plus y escanear, las membranas se vuelven a separar, se sondan con el anticuerpo anti-espectrina y se desarrollan usando el método de detección de fosfatasa alcalina. Para una valoración precisa de la masa molecular de las proteínas desarrolladas, se añaden y desarrollan simultáneamente dos conjuntos de estándares de proteínas (Magic Markers, Invitrogen, Inc).

Cromatografía líquida, SDS-PAGE, LC/espectrometría de masas.

- 20 Brevemente, el sistema LC está configurado para ejecutar dos columnas en línea: S-sefarosa y Q-sefarosa. Las muestras se filtran, la proteína (1 mg) se carga en el bucle de muestra y se ejecuta usando un gradiente de Fase móvil A (Tris-HCl 20 mM) y B (Tris-HCl 20 mM que contiene NaCl 1 M). Se recogen las fracciones (1 ml), 1 fracción por minuto, para un total de 32 fracciones. Las fracciones se concentran y se someten a SDS-PAGE en geles BioRad Criterion, geles de 18 pocillos de Tris-HCl en una concentración entre 4 % y 20 %. Las muestras se ejecutan en pares: operado de forma simulada (control); I/R; no tratado *in vitro* (control *in vitro*); caspasa-3 o calpaína-2 tratadas una junto a la otra para cada fracción. Los geles se tiñen con Coomassie-R250 y se usan para seleccionar bandas para la escisión.

- 30 La escisión de la banda, la reducción de proteínas, la alquilación, la digestión y la extracción se realizan como se describió anteriormente (Wang, K. K., Ottens, A., Haskins, W., Liu, M. C., Kobeissy, F., Denslow, N., Chen, S., y Hayes, R. L. (2004) «Proteomics studies of traumatic brain injury». *Int Rev Neurobiol* 61, 215-240)). La LC que se usa para eluir los péptidos de la columna tiene tres fases: Fase móvil A - 99,6 % de agua, 0,4 % de ácido acético; Fase móvil B - la fase orgánica: 20 % de agua, 0,4 % de ácido acético, 79,6 % de metanol; Fase móvil C - usada para cargar la muestra desde el tubo a la columna es ácido acético al 0,4 %, acetonitrilo al 4 % y agua al 95,6 %. Para la espectrometría de masas, las muestras se reconstituyeron en 15 µl de disolución de fase C móvil.

- 35 El MS es un espectrómetro de masas de trampa de iones cuadrupolo, LCQ Deca XP. Los péptidos se cargan en una columna de fase inversa y se eluyen en el MS usando un gradiente orgánico y una ionización por electroespray. Una vez que los iones están dentro del MS, se realizan varios escáneres. Primero se escanea el MS completo - se registra cada masa para cargar el valor (m/z) de la muestra que ha entrado en la trampa de iones en el momento del escaneo. Cada pico representa un valor de masa a carga que representa el ion precursor. La especificación de masas escoge los tres iones precursores más intensos y realiza otro escáner, el escáner MSMS. Cada ión precursor se fragmenta en un ión producto que produce espectros únicos para un péptido. Por lo tanto, para cada escáner MS, se producen tres espectros de MSMS, cada uno de los cuales probablemente represente un péptido diferente. La colección de todos estos escaneos trazados juntos es el cromatograma, que se envía al navegador BioWorks. Cuando un espectro en la muestra coincide con un espectro en la base de datos, se le asigna un Xcorr. Este valor indica el nivel de similitud de los dos espectros.

Curso temporal de la isquemia/reperusión del hígado de rata.

- 50 El total de 30 minutos de isquemia normotérmica total va seguido por 10, 30 y 180 minutos de reperusión. Además, se generan 30 min de isquemia parcial en los medios y en los lóbulos hepáticos izquierdos mediante el pinzamiento de la arteria hepática adecuada, las ramas portales y el conducto biliar común. Este procedimiento deja abierta la rama portal al lóbulo derecho y disminuye la hipoxia intestinal. La isquemia parcial (~70 % en el suministro de sangre) se realiza si la tasa de mortalidad a los 180 minutos de reperusión es alta después de 30 minutos de oclusión hepática total de la tríada.

Preparación de muestras hepáticas, estudios de expresión de proteínas y análisis.

- 55 Se realizaron por transferencia de tipo Western convencional. El anticuerpo usado para la determinación de la anti-espectrina es contra la molécula de espectrina total de tamaño completo (Affinity, Inc), la caspasa-3 escindió el fragmento 150i (Cell Signaling Technologies), la caspasa-3 generó el fragmento 120 kDa (Abs de nuestro laboratorio-CNPBR-UF) y la calpaína-2 escindió el fragmento 150 (CNPBR-UF). El anticuerpo contra los biomarcadores hepáticos se obtiene de diversas fuentes comerciales y no comerciales.

Preparación de muestras de suero y plasma.

5 La sangre se recoge del corazón de rata al final de los procedimientos experimentales. El plasma se obtiene de K-EDTA conservando la sangre por centrifugación. Se mezclan 20 µl de plasma o suero con 180 µl de tampón RIPA (con inhibidores de proteasas), se agitan en vórtex, se incuban en hielo durante 30 minutos y se centrifugan. Se eliminan los sobrenadantes, se mezclan alícuotas con tampón de muestra 1 : 1, se calientan y se cargan en gel.

Ensayos de enzimas séricas

Las actividades de ALT, LDH y γ-GTP se determinan usando métodos cinéticos con kits comerciales según las instrucciones del fabricante.

Inmunohistoquímica hepática

10 Las muestras hepáticas de ratas experimentales se toman al final de la reperusión para el análisis de la lesión tisular. Las muestras de tejido hepático se colocan en formalina neutra al 10 % para la tinción de rutina de H&E según un protocolo estándar o se congelan inmediatamente en tampón OCT para inmunohistoquímica.

Inmunotinción de caspasa 3 activada y calpaína-2

15 Las secciones congeladas en el hígado de 4 µm criopreservadas se fijan en paraformaldehído al 4 % enfriado en hielo en PBS o metanol a -20 °C durante 20 min en hielo. Las muestras se lavan 3 veces con PBS durante 3 minutos cada una, se permeabilizan en hielo con Tritón X-100 al 0,5 % frío/PBS/sacarosa al 0,2 %, se lavan con PBS y se enfrían rápidamente con borohidruro de sodio al 0,1 % durante 5 min. Las muestras se bloquean a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos en suero de cabra al 20 % en PBS y se incuban durante toda la noche (+40 °C) en suero de cabra al 20 %/PBS con caspasa-3 activada (proteína de 17/19 kDa, Cell Signaling, Inc.) o el anticuerpo monoclonal de ratón calpaína-2 (Chemicon, Inc.). Después de un lavado prolongado, los cubreobjetos se incuban con IgG antirratón conjugada con un colorante fluorescente (AlexaGreen 488, Molecular Probes). Los cubreobjetos se montan y se analizan usando un microscopio fluorescente equipado con la cámara óptica (Zeiss, Inc).

20

Ensayos TUNEL *in situ* en la sección de tejido hepático.

25 Los ensayos TUNEL se realizan usando el kit comercial PROMEGA. Las muestras hepáticas se fijan en formalina tamponada al 10 % y se embeben en parafina. Las secciones de tejido se colocan en portaobjetos y después se desparafinan y se rehidratan. Los portaobjetos se someten a digestión con proteinasa K durante 15 minutos (Tris 0,2 M/EDTA 0,5 M, pH 8,0, proteinasa K 1 mg/ml). Los portaobjetos se lavan con PBS, se equilibran con tampón durante 15 minutos y se tiñen con mezcla de nucleótidos conjugados con FITC y TdT durante 80 minutos. La reacción enzimática se detiene, los portaobjetos se contrastan con una disolución de ADN de yoduro de propidio/antidestefimiento y se fotografían usando un microscopio fluorescente equipado con la cámara óptica (Zeiss, Inc.) con un filtro apropiado.

30

Anticuerpos ASS

35 Un anticuerpo monoclonal contra el extremo C' de ASS está disponible comercialmente (BD Transduction Laboratories). Se están produciendo anticuerpos monoclonales adicionales en el Hybridoma Core Laboratory en el Programa de Biotecnología de la Universidad de Florida. Los ratones se inmunizan con los mismos materiales que se usaron para preparar el anticuerpo policlonal antiASS específico en conejos. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales deseados se clonan dos veces para asegurar su estabilidad y pureza. Al menos 100 alícuotas de células fundadoras de hibridoma clonadas se congelan para garantizar un suministro de anticuerpos durante toda la vida.

40 Análisis de anticuerpos

45 Las afinidades de unión a antígeno de todos los anticuerpos ASS se analizan usando ELISA indirecto, transferencias de tipo Western y BIAcore 3000. Para cada captura y detección de ELISA específicos, se seleccionan pares de anticuerpos que proporcionan una unión y afinidad de antígeno óptimas. La selección de anticuerpos se basa en aquellos anticuerpos que tienen afinidades altas y reconocen diferentes epítomos en los biomarcadores. Se seleccionan anticuerpos que tienen constantes de alta afinidad compuestas por una velocidad de activación rápida y una velocidad de desactivación lenta cuando se determina por BIAcore 3000 (Protein Chemistry Core en la Universidad de Florida) El BIAcore es un dispositivo basado en chip que permite la determinación de constantes de afinidad (incluidas las velocidades de activación y desactivación) de las interacciones entre proteínas y otras proteínas, péptidos o ADN. El instrumento usa un sistema de detección de resonancia de plasmón de superficie altamente sensible que permite la determinación precisa de constantes de afinidad en tiempo real sin la adición de etiquetas exógenas.

50

Producción de antígeno ASS recombinante y validación de ELISA SW

El ADNc de ASS está disponible comercialmente de ATCC y se usa para la producción de proteína recombinante. Para el ensayo de curva estándar, se analiza una dilución en serie de 50 ng a 0,001 ng de proteína purificada/pocillo.

Esto determina el intervalo dinámico del ensayo que se anticipa que sea de 100 a 1000 veces, abarcando concentraciones que probablemente estén presentes en la sangre o el suero. Los datos de ELISA SW han demostrado que la sensibilidad es mayor que la transferencia de tipo Western ECL altamente sensible (nivel de pg alto)

BIAcore:

5 Dos pmol de proteína biomarcadora (50 ng) en PBST se diluyeron en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5). FC1 era un chip CM5 que se usó como control, mientras que FC2 se activó y se inyectó con 5 µl de biomarcador a 10 µl/min, lo que produjo un ΔRU de 475. Los anticuerpos se diluyeron 1 : 10 en PBST y se inyectaron 20 µl durante 2 min (kinject) seguido de disociación durante 3 min. La regeneración de la superficie se realizó mediante la inyección de 5 µl de glicina (10 mM, pH 1,5). La inyección y regeneración de anticuerpos se repitió sin pérdida de reactividad superficial.

10 Ejemplo 1: Expresión de argininosuccinato sintasa (ASS)

Los datos muestran que la proteína ASS se expresa en tejidos de ratas adultas en el hígado, en mucho menor grado en el riñón, y en niveles muy bajos, en los testículos. (i) ASS y sus productos de descomposición mediados por caspasa-3 fueron regulados hacia arriba en el hígado y (ii) ASS acumulado en plasma después de 30 minutos de isquemia hepática seguida de 30 minutos de reperfusión. Se realizaron varios experimentos usando un modelo de rata de isquemia/reperfusión con el énfasis particular en el tiempo de reperfusión diferente con un período fijo de 30 minutos de isquemia. La acumulación de ASS en sangre fue dependiente del tiempo y alcanzó un estado estable a las 3 horas después de la reperfusión. Los niveles de ASS en plasma se correlacionaron fuertemente con la gravedad del daño hepático determinada por el análisis histológico clásico del tejido hepático y la inmunotinción con caspasa-3 activada.

20 Ejemplo 2: ELISA de tipo sándwich para la detección específica y cuantitativa de argininosuccinato sintasa (ASS) en fluidos biológicos.

Sobre la base de la secuencia publicada de la proteína ASS humana (P00966), se diseñaron y se sintetizaron dos péptidos: N-47-ARKKALKLGAKKV-59-C (SEC ID NO: 1) y N-214-AKAPNTPDILEIEFKK-229-C (SEC ID NO: 2). Actualmente, estos péptidos se emplean para producir anticuerpos policlonales de conejo.

25 El ensayo ELISA de tipo sándwich se usa como diagnóstico para la lesión isquémica hepática en seres humanos. Esto incluye trasplante de hígado, insuficiencia hepática aguda de diversas etiologías, choque séptico debido a traumatismo abdominal y múltiple. Los datos muestran que, de manera similar a las ratas, el ASS plasmático no se detecta en el control de personas sanas.

30 El ELISA se normaliza contra una medición de cantidades conocidas de ASS en fluidos biológicos, como suero y plasma y tejidos, incluido el hígado. El ASS estándar se obtiene como proteína recombinante marcada con GST. Se determinó que el anticuerpo monoclonal ASS reconoció ASS a 46 kDa con alta especificidad y sensibilidad. Este anticuerpo se usa como un anticuerpo de detección en el ELISA específico. Los dos anticuerpos policlonales de conejo producidos que son específicos para ASS se prueban usando BIAcore y la concentración se optimiza para su uso en el ELISA variando la concentración de anticuerpo y ASS estándar en experimentos de titulación controlada. Se prueban varias concentraciones de proteína y anticuerpo para determinar la especificidad y la sensibilidad del anticuerpo. Las concentraciones de proteína y anticuerpo que dan el 80 % de la unión más alta se eligen para el ELISA de tipo sándwich.

40 Para determinar la reactividad y la especificidad de los anticuerpos, un panel de tejido se prueba por transferencia de tipo Western. Se usa un método ELISA indirecto con la proteína ASS recombinante unida a la placa ELISA para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos que se usan en el ensayo. Este ensayo determina la concentración robusta de anti-ASS para usar en el ensayo. Las microplacas de 96 pocillos están recubiertas con 50 ng/pocillo y los anticuerpos anti-ASS de conejo y ratón se diluyen en serie comenzando con una dilución de 1 : 250 hasta 1 : 10 000 para determinar la concentración óptima para usar en el ensayo. Un anticuerpo de detección secundario marcado de peroxidasa de rábano picante (HRP) anticonejo (o ratón) y Ultra-TMB se usan como sustratos de detección para evaluar los resultados.

45 Una vez que se determina la concentración de anticuerpo para la señal máxima, se determina el límite de detección máximo del ELISA indirecto para cada anticuerpo. La microplaca de 96 pocillos se recubre desde 50 ng/pocillo diluida en serie a <1 pg/pocillo. Para la detección, los anticuerpos se diluyen a la concentración determinada anteriormente. Esto proporciona un intervalo de sensibilidad para los ensayos ASS ELISA y la elección del anticuerpo para la captura y detección.

50 Para optimizar y mejorar la señal en el ELISA de tipo sándwich, el anticuerpo de detección está directamente etiquetado con HRP para evitar cualquier reactividad cruzada y mejorar la señal con el sistema de amplificación, que es muy sensible. Este formato y esta amplificación han funcionado exitosamente para otros biomarcadores en nuestro laboratorio. Para construir el ensayo ELISA SW, los pocillos de la placa de 96 pocillos se recubren con concentraciones de saturación de anticuerpo purificado (250 ng/pocillo), la concentración de antígeno ASS variará de 50 ng a <1 pg/pocillo y el anticuerpo de detección estará en la concentración determinada anteriormente. Inicialmente, el complejo se detecta con un anticuerpo secundario etiquetado con HRP para confirmar el formato ELISA SW, pero reemplazará el sistema de detección por el anticuerpo de detección etiquetado con HRP.

Ejemplo 3: Identificación de proteínas alteradas y sus productos de degradación en el hígado de rata

- Las ratas (Sprague Dawley, macho, de 225 g a 250 g) se anestesiaron con isoflurano, se inmovilizó el ligamento hepatoduodenal y la tríada hepática (vena portal, arteria hepática y conducto biliar) se ocluyó con una pinza vascular pequeña durante 30 min de isquemia normotérmica seguida de 30 minutos de reperfusión. Al final, se retiró la sangre; el hígado se perfundió brevemente con PBS enfriado con hielo y se extrajo para su análisis. Las ratas operadas de forma simulada fueron sometidas a anestesia sin ligadura de tríada hepática. El tejido hepático y la sangre intactos se obtuvieron inmediatamente después de la anestesia en ratas. Los tejidos hepáticos intactos se trataron *in vitro* con caspasa-3 recombinante o calpaína-2. Inicialmente, para el descubrimiento de biomarcadores de lesiones I/R, se diseñó una minimatriz personalizada de 40 anticuerpos.
- Los resultados se presentan como imágenes minirrejilla de control de 40 anticuerpos de inmunotransferencia de tipo Western (de operación simulada) y muestras I/R, muestras intactas tratadas con caspasa-3 *in vitro* y muestras tratadas con calpaína-2.

Ejemplo 4: Caracterización de nuevos biomarcadores hepáticos de lesión hepática

- La aII-espectrina hepática se escindió en el hígado I/R a través de caspasa-3 y calpaína-2 con acumulación de SBDP 150 kDa y 120 kDa (fig. 3A). La caracterización y comparación de tres proteínas hepáticas como biomarcadores potenciales de lesión hepática inducida por I/R, incluyó lo siguiente: argininosuccinato sintasa (AS), isoforma hepática de glutatión-S-transferasa (GST-BB) y también γ -GTP y ALT, marcadores clásicos de lesión hepatocelular. Se examinaron AS y γ -GTP en tejidos hepáticos usando el análisis de transferencia de tipo Western con un énfasis particular en la acumulación de posibles productos de degradación a través de caspasa-3 o calpaína-2 (fig. 3B y 3C).
- Como se ve en la fig. 3C, una banda principal de γ -GTP en el hígado (~140 kDa) es diferente de una M. M. predicha de 90 kDa, y parece estar modificada en el hígado I/R de manera similar a los hígados tratados con caspasa-3 con acumulación adicional de ~70 kDa de inmunoreactividad menor. La validación preliminar de los valores de diagnóstico de nuevos biomarcadores hepáticos se realizó en plasma sanguíneo.

- Se ha encontrado que la proteína ASS intacta (46 kDa) se acumuló en el plasma de ratas sometidas a isquemia/reperfusión de 30/30 minutos, pero estuvo ausente en el plasma de ratas normales o de operación simulada y en ratas con administración alcohólica crónica. Sorprendentemente, no hubo fragmentos de escisión de ASS en el plasma I/R a diferencia de lo que se observó en el tejido hepático en este momento (fig. 3 B). Se detectaron niveles muy bajos de GST-BB, isoforma hepática de GST, en plasma de rata normal como proteína de ~51 kDa (predicho M. M. - de 23 kDa a 25 kDa). GST-BB desapareció en ratas simuladas e I/R, mientras que hubo un aumento significativo en GST-BB en ratas tratadas crónicamente con alcohol. Los niveles de ALT en plasma (57 kDa de M. M. predicho) se mantuvieron sin cambios en las ratas I/R y operadas de forma simulada. En contraste, la ALT en el plasma de rata alcohólica crónica se incrementó junto con un ligero cambio de las bandas inmunorreactivas y la aparición de fragmentos, lo que puede indicar escisión de ALT.

Ejemplo 5: Análisis proteómico

- El análisis proteómico se aplica al hígado IR de la rata. Las proteínas se resuelven mediante cromatografía de intercambio iónico bifásico en columnas consecutivas de S y Q-sefarosa en tándem con electroforesis en gel (CAX-PAGE). La visualización diferencial de las proteínas se logra mediante la tinción visible con azul de Coomassie, todas realizadas en tándem en los mismos geles. Las proteínas con expresión diferencial o modificaciones se identifican usando el software de identificación de analizador HT (Nonlinear Dynamics) y se extraen para digestión con tripsina en gel. Los digeridos se analizan usando cromatografía líquida de nanoespray en línea con espectrometría de masas en tándem (nano-LC/MSMS). Los espectros de masas en tándem resultantes se correlacionan con secuencias de péptidos tripticos extraídas de una base de datos de proteínas de mamíferos no redundantes utilizando el algoritmo Sequest. Varias proteínas homólogas posibles se generan normalmente usando este enfoque. La masa molecular de la banda de proteína en el gel de SDS-PAGE se compara con las masas moleculares predichas para las proteínas secuenciadas que se encuentran en las bases de datos.

Tabla 1. Biomarcadores de lesión por isquemia/reperfusión hepática.

Biomarcador hepático	Masa molecular	Fragmentos de escisión en hígado	Tasa de cambio en el hígado frente a simulado	Método de detección
Argininosuccinato sintetasa (AS)	46 kDa	34 kDa, 31 kDa y 24 kDa	31 kDa y 34 kDa expresados en hígados I/R; se incrementa >>10 veces	HTS-WB, transferencia
Escualeno sintasa (SQS)	48 kDa	36 kDa, escindida a través de mecanismo desconocido	Apareció como 36 kDa en I/R hígado	HTS-WB.
Glucógeno hepático fosforilasa (GP)	97 kDa	Escindido; degradación los productos no son	Banda de 97 kDa reducida en el hígado I/R	LC/MS seguido por

Sulfotransferasa (ST)	31 kDa	determinados Escindido; los fragmentos 31 kDa casi desaparece en determinados	hígado I/R	secuenciación LC/MS seguido por secuenciación
-----------------------	--------	--	------------	--

5 Las muestras también se procesaron en tándem para las muestras hepáticas de operación simulada (C) y las muestras de I/R (T). Las proteínas con expresión diferencial se identificaron usando el software de identificación del analizador HT (Nonlinear Dynamics) y se ajustaron al cuadrado. Las bandas de proteína se escindieron del gel (banda C y banda T si estaban presentes) y se digirieron con tripsina. Las digestiones se analizaron usando cromatografía líquida de nanoespray en línea con espectrometría de masas en tándem (nano-LC/MSMS). Los espectros de masas en tándem resultantes se correlacionaron con secuencias de péptidos trípticos extraídas de una base de datos de proteínas de mamíferos no redundantes utilizando el algoritmo Sequest. Las coincidencias de péptidos solo de alta correlación 10 espectral se recogieron mediante el uso del filtrado de datos del software DTASelect, y se compararon los proteomas de IR frente al hígado simulado usando el software Contrast. La identificación y el análisis de las proteínas hepáticas más relevantes realizadas hasta el momento se presentan a continuación. Estas proteínas disminuyeron significativamente (p. ej., T7A frente a C7A) o desaparecieron completamente (p. ej., T4 frente a C4) en tejido hepático I/R en comparación con hígados operados de forma simulada.

Ejemplo 6: Pacientes con trasplante de hígado

15 La figura 29 muestra los valores séricos de ASS de seis pacientes con trasplante de hígado. Se recogieron muestras séricas de pacientes con trasplante de hígado (n = 6) antes de que se produjera el trasplante (referencia), mientras que se retiró el hígado (ahepático) y en varios instantes de tiempo después de insertar el nuevo hígado en los pacientes (1 min o 3 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min). Los niveles de ASS sérico se midieron mediante ELISA SW ASS específico (en ng/ml). Los valores de 150 ng/ml excedieron de la sensibilidad del ensayo.

20 Tabla 2. Proteínas hepáticas identificadas mediante cromatografía líquida nanoespray con espectrometría de masas en tándem (nano-LC/MSMS), que disminuyen o desaparecen en el tejido hepático I/R frente a hígado operado de forma simulada después de la visualización diferencial en SDS-PAGE.

Banda	GI	Nombre de la proteína	Predicho Masa	Observado Masa	C pep	% C	T pep.	% T
4	gi: 6978809	enolasa 1, alfa. [<i>Rattus norvegicus</i>]	47,5	47	4	11		
6A	gi: 11560087	glucógeno fosforilasa hepática [<i>Rattus norvegicus</i>]	97,9	99	2	2,1		
7A	gi: 11560087	glucógeno fosforilasa hepática [<i>Rattus norvegicus</i>]	97,9	99	8	17,5	2	4,8
10	gi: 6981594	Estrógeno sulfotransferasa [<i>Rattus norvegicus</i>]	35,4	35	2	7,1		
12	gi: 8393186	carbamoil-fosfato sintetasa 1; [<i>Rattus norvegicus</i>]	164,6	120	2	1,5		
13	gi: 8393186	carbamoil-fosfato sintetasa 1; [<i>Rattus norvegicus</i>]	164,6	120	3	2,3		
14A	gi: 8392839	ATP citrato liasa [<i>Rattus norvegicus</i>]	121,5	120	2	2,8		
	gi: 8393186	carbamoil-fosfato sintetasa 1; [<i>Rattus norvegicus</i>]	164,6	120	5	4,1		
14C	gi: 8393322	proteína regulada por glucosa, 58 kDa [<i>Rattus norvegicus</i>]	57	56	6	13,1		

Otras realizaciones

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5 **Listado de secuencias**

<110> Universidad de Florida Research Foundation, Inc.

<120> Biomarcadores de lesiones hepáticas

10 <130> 502-21

<140> Patente Europea EP 06 749 137

<141> 31-03-2006

15 <150> Patente Estadounidense US 60/668,121

<151> 01-04-2005

<160> 2

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Arg Lys Lys Ala Leu Lys Leu Gly Ala Lys Lys Val
1 5 10

30 <210> 2

<211> 16

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Lys Ala Pro Asn Thr Pro Asp Ile Leu Glu Ile Glu Phe Lys Lys
1 5 10 15

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una lesión hepática en un sujeto, que comprende:
 - detectar un aumento de argininosuccinato sintetasa (ASS) en una muestra de sangre de un sujeto sospechoso de tener lesión hepática;
- 5 en donde una cantidad aumentada de ASS en comparación con la cantidad o ausencia de ASS en un sujeto normal es indicativo de lesión hepática, en donde la lesión hepática se selecciona del grupo que consiste en lesión hepática isquémica, lesión hepática traumática, lesión hepática térmica, lesión hepática causada por cirugía abdominal, lesión hepática causada por choque hemorrágico, lesión hepática causada por choque séptico, lesión hepática causada por heridas de bala abdominales, lesión
 - 10 por trasplante hepático, lesión hepática endotóxica aguda, lesión hepática causada por reacciones de hipersensibilidad a fármacos, lesión hepática por colestasis, lesión hepática causada por lesión del endotelio vascular, lesión hepática causada por la exposición a la radiación y lesión hepática mecánica.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar uno o más biomarcadores en dicha muestra de sangre, en donde dichos biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en ASL, SQS, EST-1, GP, CPS-1,
 - 15 alfa-enolasa-1, GRP y productos de degradación proteolítica de la espectrina (SPBP).
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además la detección de la isoforma glutatión-S-transferasa (GST-BB).
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar uno o más biomarcadores que consisten en ALT, LDH y proteína regulada por glucosa (GRP).
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre es suero o plasma.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la lesión hepática es una lesión hepática isquémica y en donde pueden detectarse niveles elevados de ASS en sujetos con lesión hepática isquémica dentro de los 180 minutos posteriores a la lesión en comparación con los niveles de ASS en sujetos normales.
7. El método de la reivindicación 1, en donde ASS se detecta mediante inmunoensayo con un anticuerpo generado
 - 25 contra un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2 o con anticuerpos generados contra los polipéptidos que consisten en secuencias de aminoácidos establecidas en SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.
8. El método de la reivindicación 3, en donde la lesión hepática por alcoholismo crónico está indicada por el aumento de los niveles plasmáticos de GST-BB en comparación con los sujetos con lesión hepática isquémica que no tienen
 - 30 GST-BB detectable o sujetos normales donde solo son detectables niveles bajos de GST-BB.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la detección es por cromatografía líquida (LC), electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas, ensayo de enzimas séricas, inmunohistoquímica hepática o inmunoensayo.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el inmunoensayo es un ELISA.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en donde el ELISA es un ELISA de tipo sándwich.
12. Un uso de arginosuccinato sintetasa (ASS) para controlar el trasplante de hígado.
13. El uso de la reivindicación 12, en donde el trasplante de hígado se controla comparando los niveles de ASS en muestras de tejido antes y después del trasplante de un hígado donante, en donde la muestra de tejido es sangre, plasma o suero.
- 40 14. El uso de la reivindicación 13, en donde los niveles de ASS se determinan con un agente colorimétrico, fluorogénico o quimioluminiscente, anticuerpo o sustrato.
15. Uso de la reivindicación 14, en donde los niveles de ASS se determinan con al menos un anticuerpo que reacciona específica e individualmente con el ASS.
- 45 16. El uso de la reivindicación 15, en donde al menos un anticuerpo se produce a partir de la SEC ID NO: 1 o la SEC ID NO: 2 para detectar específicamente ASS.
17. Uso de un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 1 para detectar una lesión hepática en un sujeto, comprendiendo el kit:
 - (a) un sustrato para contener una muestra de sangre aislada de un sujeto sospechoso de tener lesión hepática;
 - (b) un anticuerpo que detecta de forma selectiva e independiente la argininosuccinato sintetasa (ASS) y

- 5 opcionalmente uno o más anticuerpos que detectan de manera selectiva e independiente al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en argininosuccinato liasa (ASL), estrógeno sulfotransferasa hepática (EST-1), escualeno sintasa (SQS), glucógeno fosforilasa hepática (GP), carbamoilfosfato sintetasa (CPS-I), α -enolasa 1, proteína regulada por glucosa (GRP) y productos de degradación de la espectrina (SBDP) e
- (c) instrucciones impresas para hacer reaccionar un agente o sustrato con la muestra biológica para detectar la presencia de al menos un biomarcador;
- en donde la lesión hepática es una lesión por trasplante, una lesión isquémica hepática o una lesión hepática causada por un choque séptico.
- 10 18. Uso de una composición de anticuerpo de diagnóstico para llevar a cabo el método de la reivindicación 1 para detectar lesión hepática, comprendiendo dicha composición de anticuerpo de diagnóstico un anticuerpo que se une específicamente a SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2.
- 15 19. El método de la reivindicación 1, en donde la lesión hepática es una lesión hepática por trasplante y en donde pueden detectarse niveles elevados de ASS en sujetos con lesión hepática por trasplante dentro de los 120 minutos posteriores a la lesión en comparación con los niveles de ASS en sujetos normales.

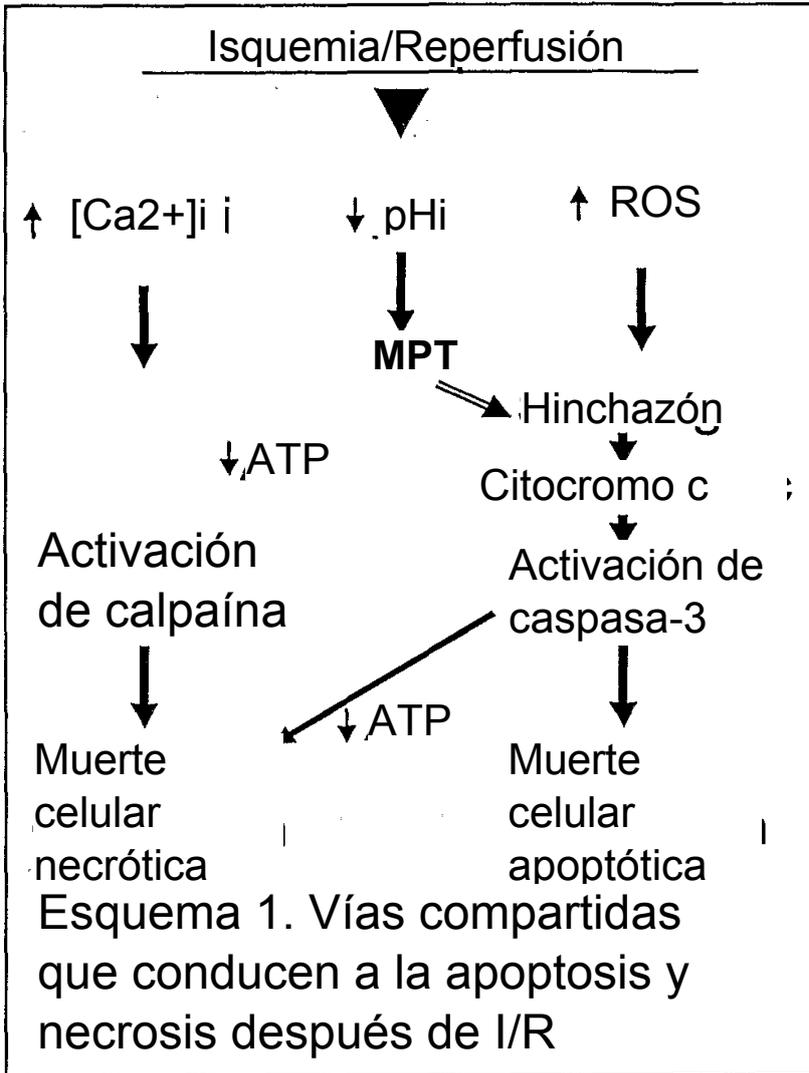


FIGURA 1

Tejido hepático

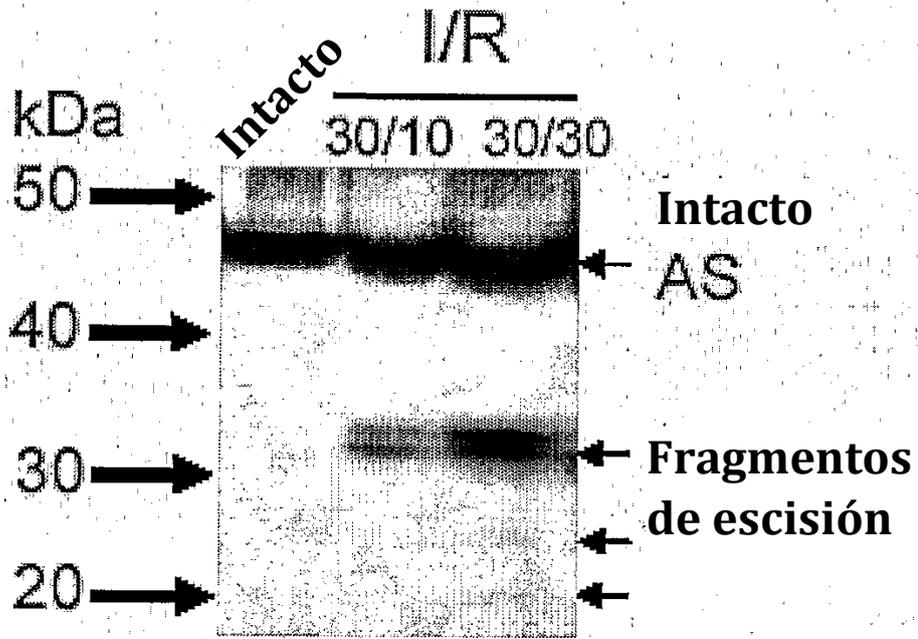


FIGURA 2

Tejido hepático

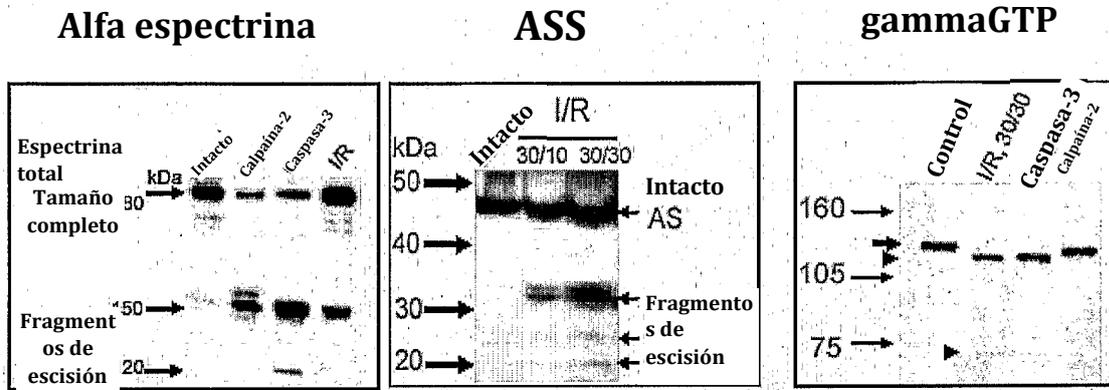


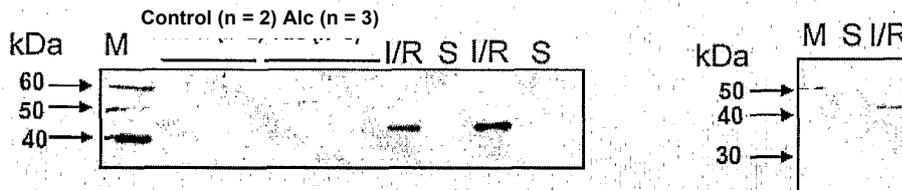
FIGURA 3

ASS en plasma de rata

Peso molecular predicho - 46 kDa

Experimento 1: tinción ECL

Experimento 2: tinción con fosfatasa alcalina (color)



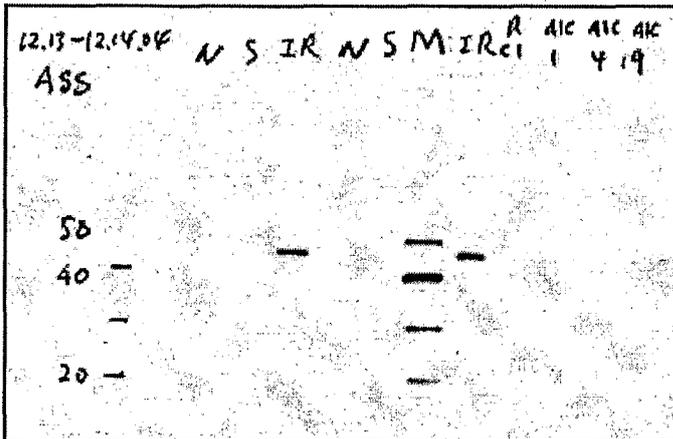
Alc- Ratas con tratamiento de alcoholismo crónico
I/R- isquemia/reperfusión hepática
S- Ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta

FIGURA 4A-B

ASS en plasma de rata

Peso molecular predicho - 46 kDa

Experimento 3: tinción ECL



M- marcadores de peso molecular

Alc- Ratas con tratamiento de alcoholismo crónico

I/R- isquemia/reperfusión hepática

S- ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta

FIGURA 5

Reperfusión en el curso del tiempo de ASS en plasma de rata en suero después de 30 minutos de isquemia.

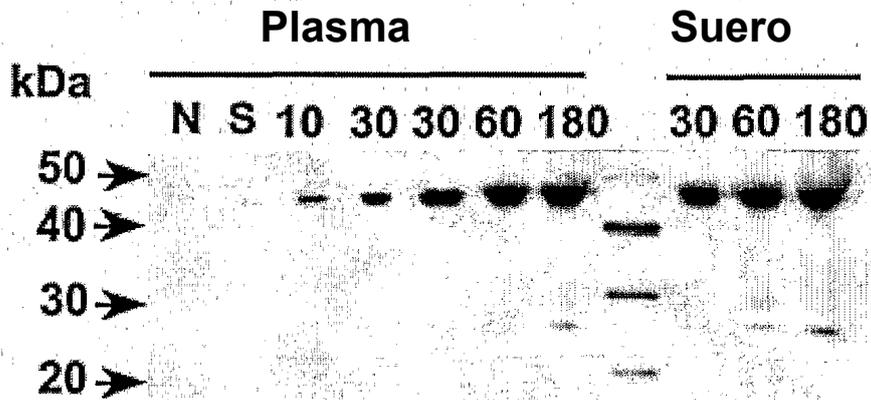


FIGURA 6

EST-1

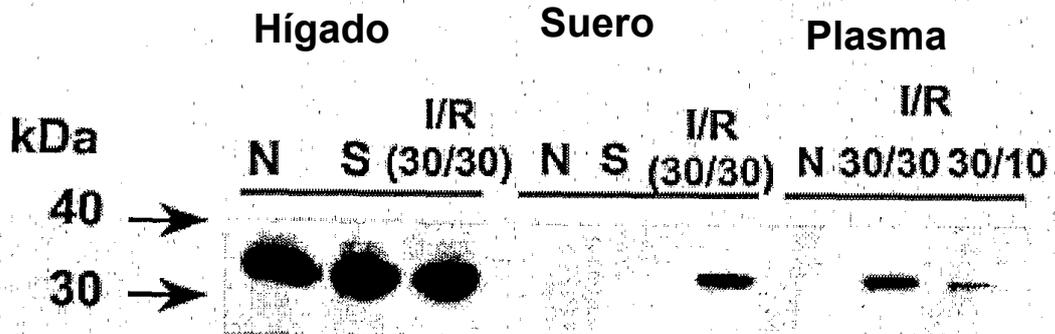
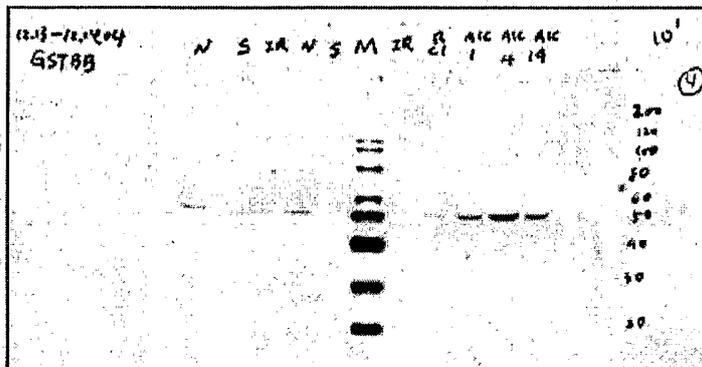


FIGURA 7

Glutación-S-transferasa (BB) en plasma de rata

Peso molecular predicho - de 23 kDa a 25 kDa

Experimento 3: tinción ECL



Alc- Ratas con tratamiento de alcoholismo crónico

I/R- isquemia/reperfusión hepática

S- Ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta

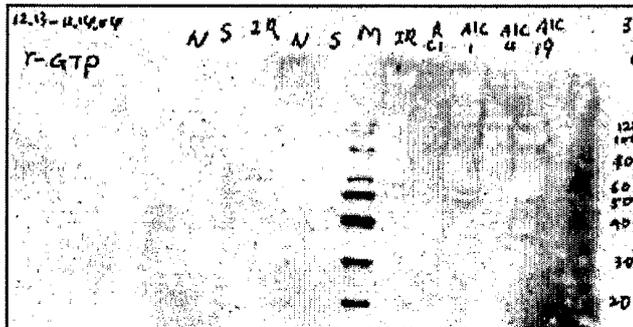
N- Ratas intactas, sin tratamiento

FIGURA 8

Gamma-GTP en plasma de rata

Peso molecular predicho - 90 kDa

Experimento 3: tinción ECL



M- marcadores de peso molecular

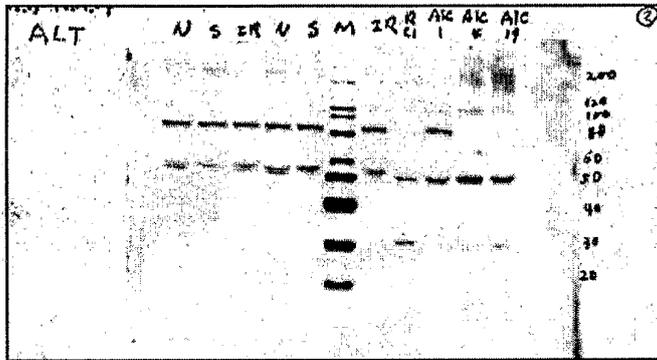
- Alc- Ratas con tratamiento de alcoholismo crónico
- I/R- isquemia/reperfusión hepática
- S- Ratas operadas de forma simulada, sin ligadura de vena porta
- N- Ratas intactas, sin tratamiento

FIGURA 9

ALT en plasma de rata

Peso molecular predicho - 57 kDa

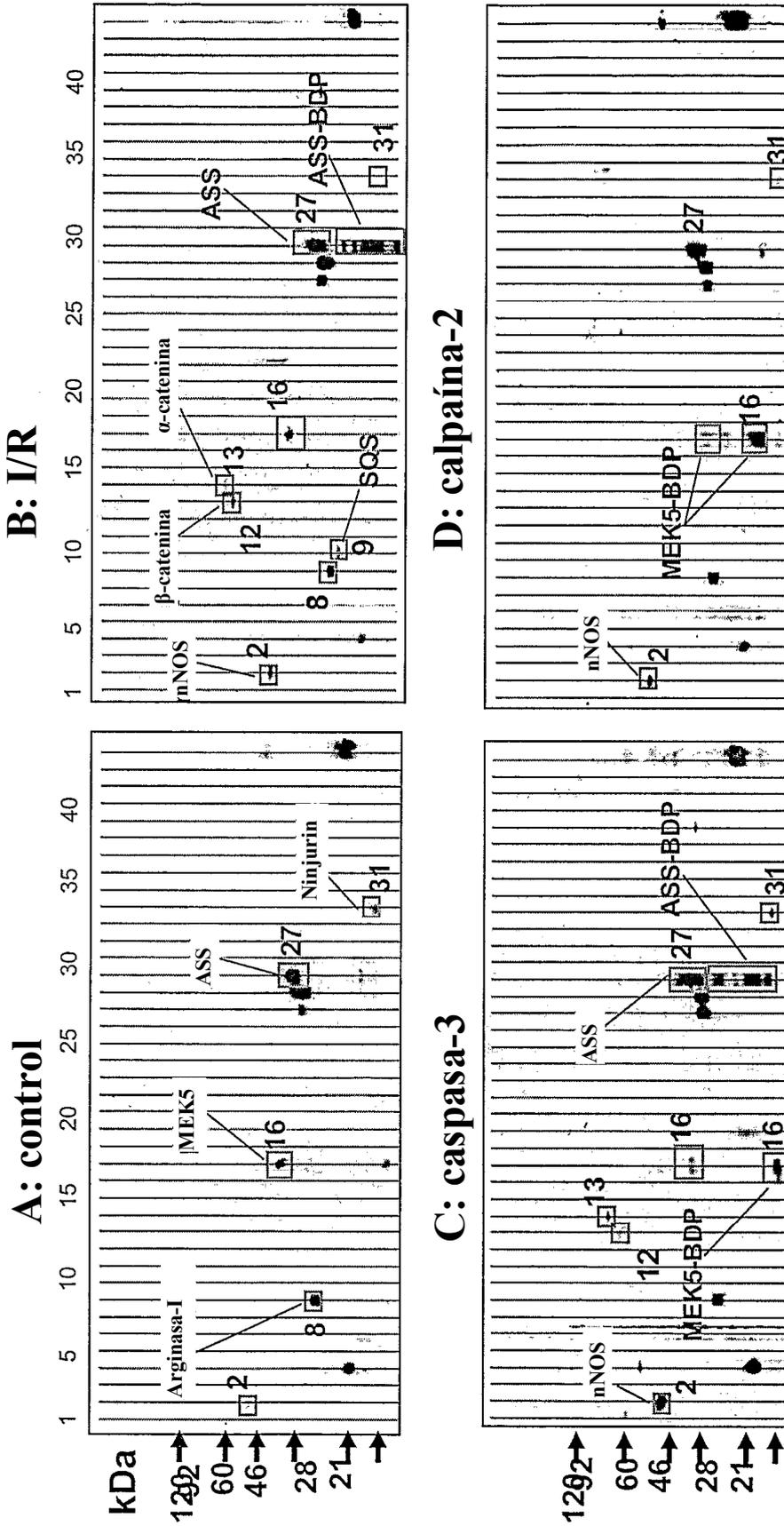
Experimento 3: tinción ECL



M- marcadores de peso molecular

- Alc- Ratas con tratamiento de alcoholismo crónico
- I/R- isquemia/reperfusión hepática
- S-ratas operadas de manera simulada, sin ligadura de vena porta
- N- ratas intactas, sin tratamiento

FIGURA 10



FIGURAS 11A-11D

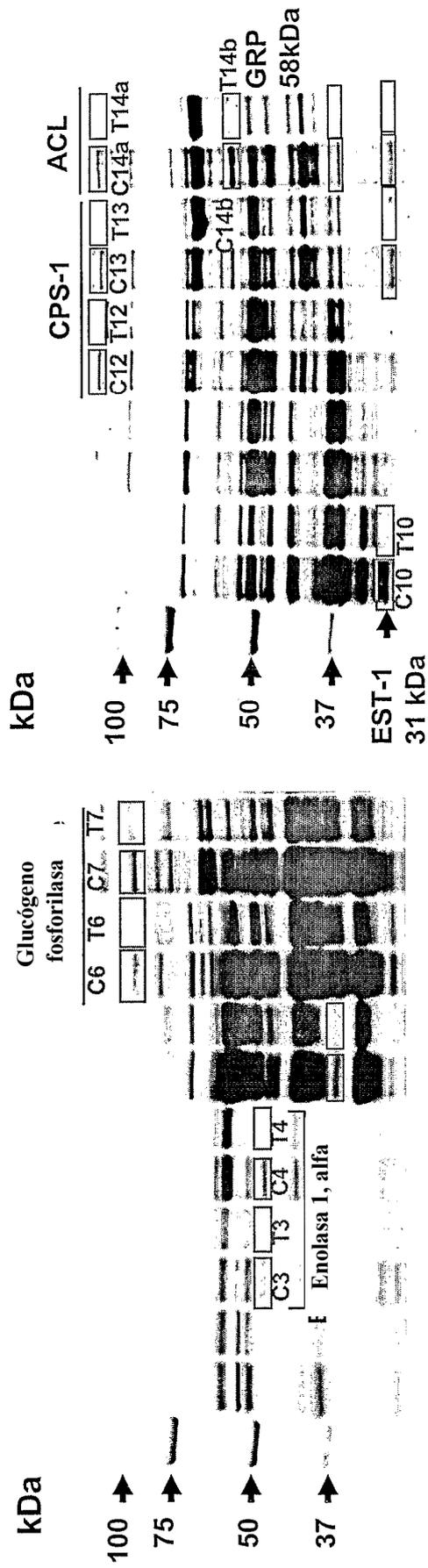


FIGURA 12

Panel de tejido de rata ASS

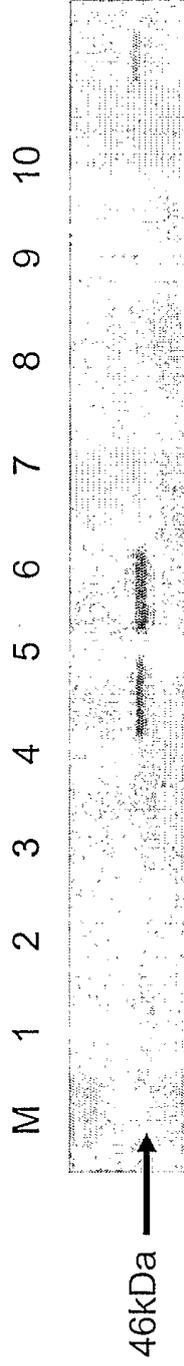


FIGURA 13A

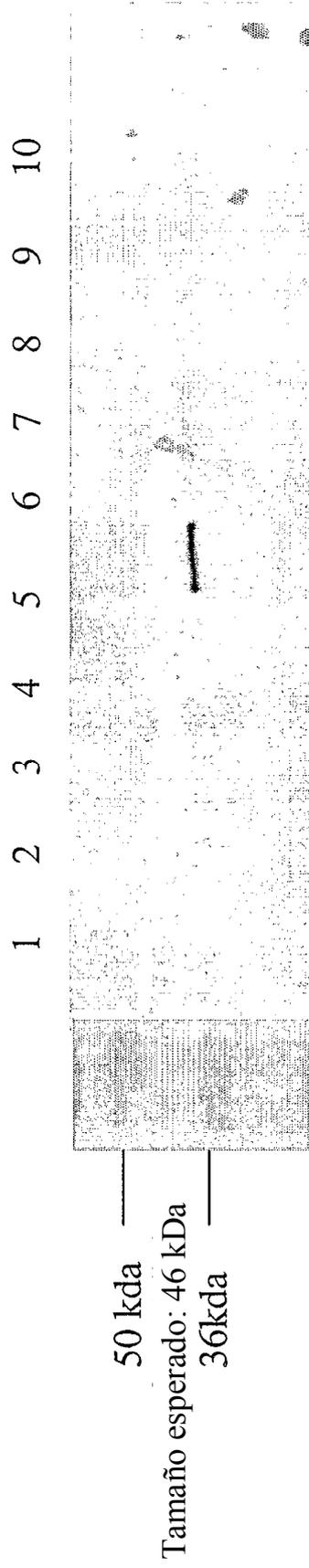


FIGURA 13B

Panel de tejido de rata

- 1: Cerebro
- 2: Diafragma
- 3: Corazón
- 4: Riñón
- 5: Hígado
- 6: Pulmón
- 7: Esqueleto
- 8: Piel
- 9: Bazo
- 10: Testículos

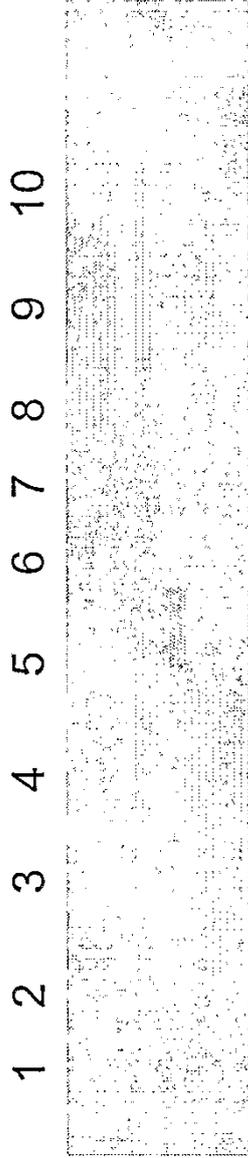


FIGURA 14

Panel de tejido humano parcial ASS

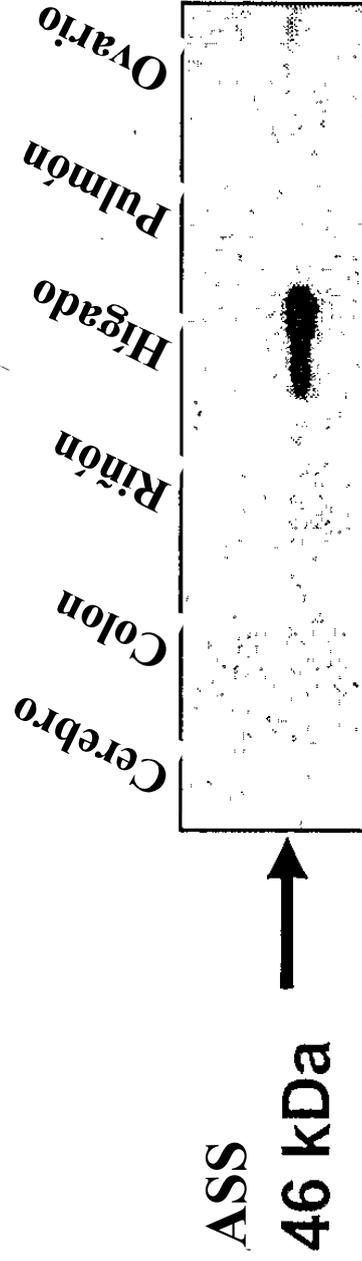
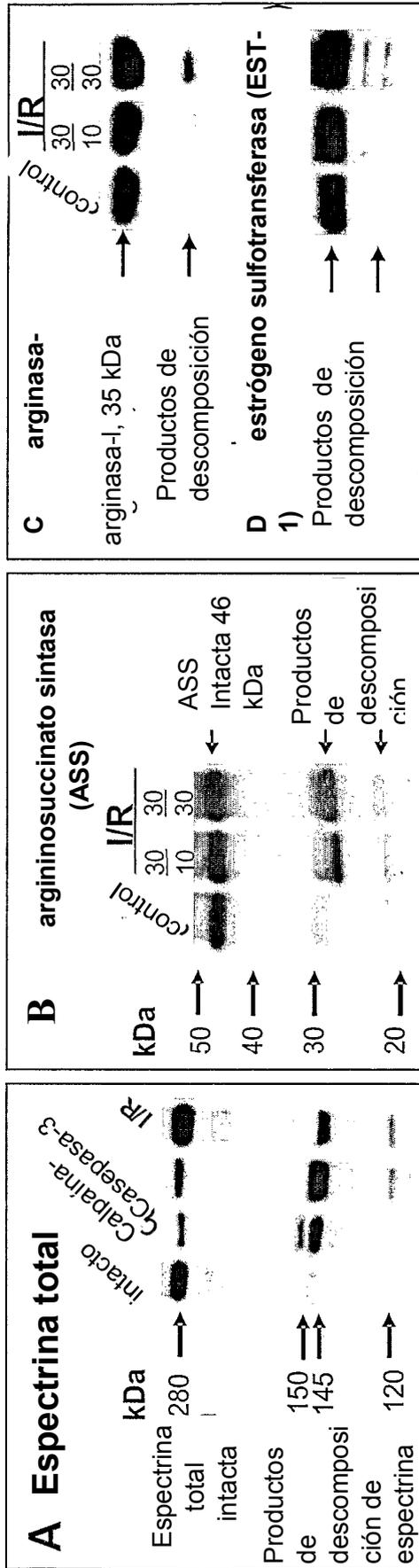
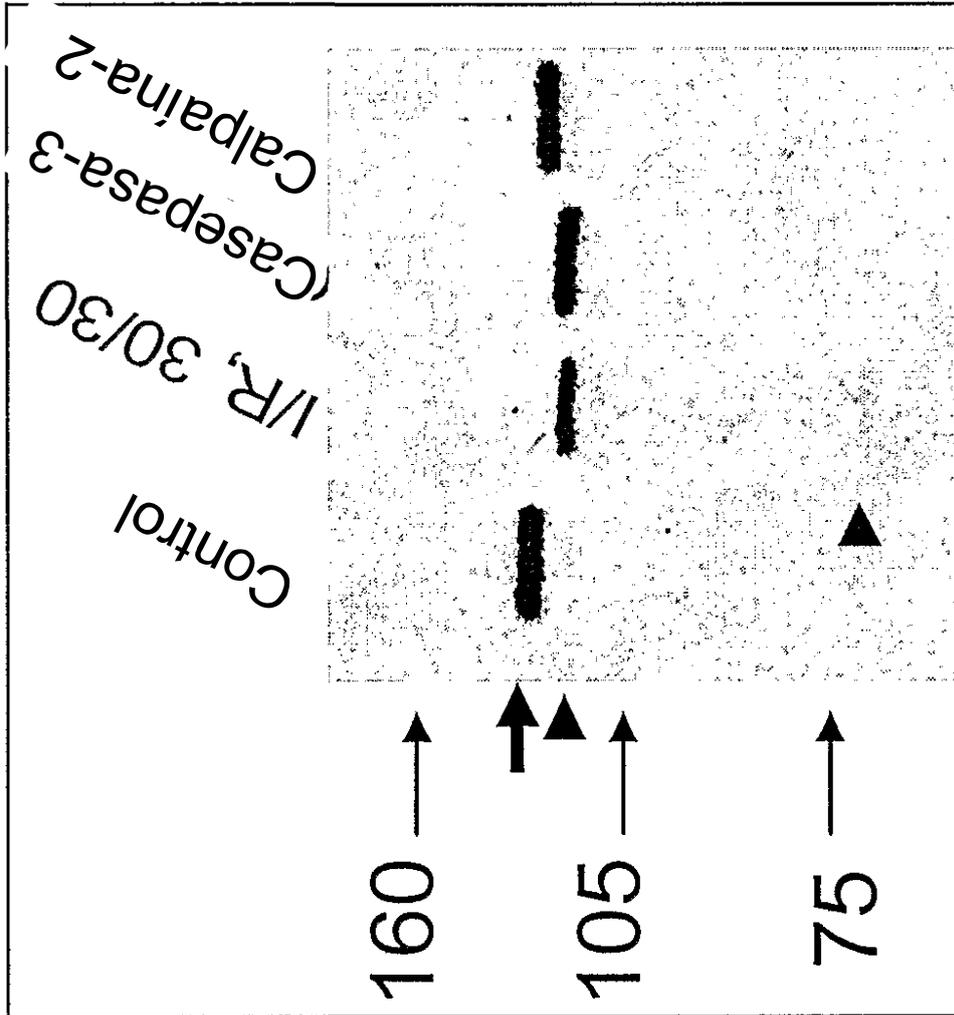


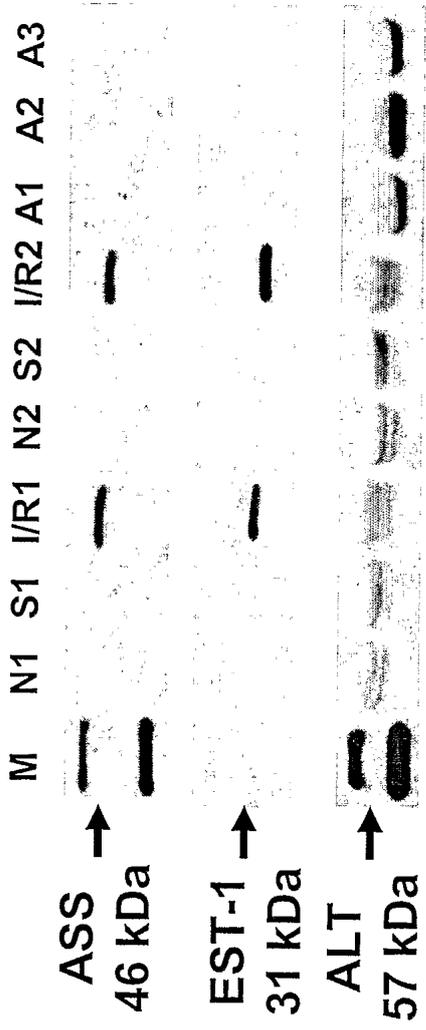
FIGURA 15



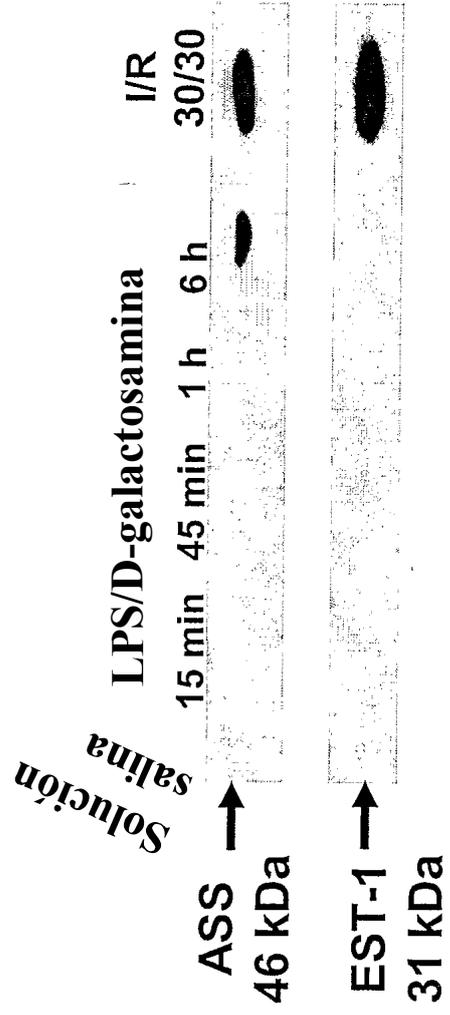
FIGURAS 16A-16D



FIGURAS 17



FIGURAS 18A



FIGURAS 18B

FIGURA 19A

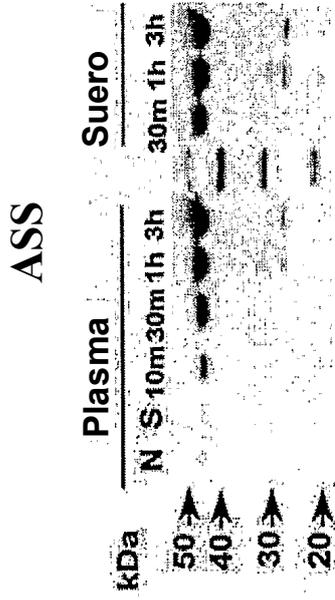
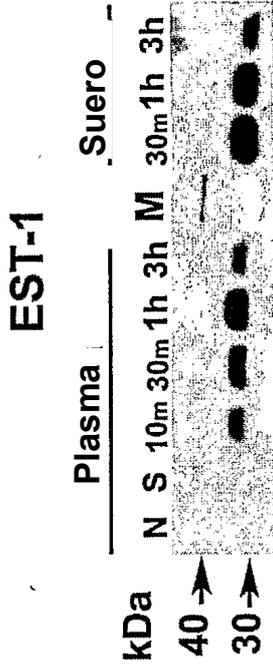


FIGURA 19B



ASS

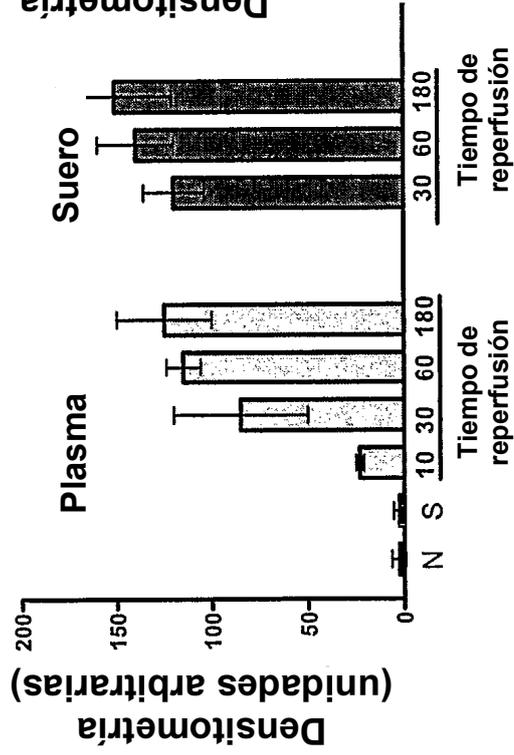


FIGURA 19C

EST-1

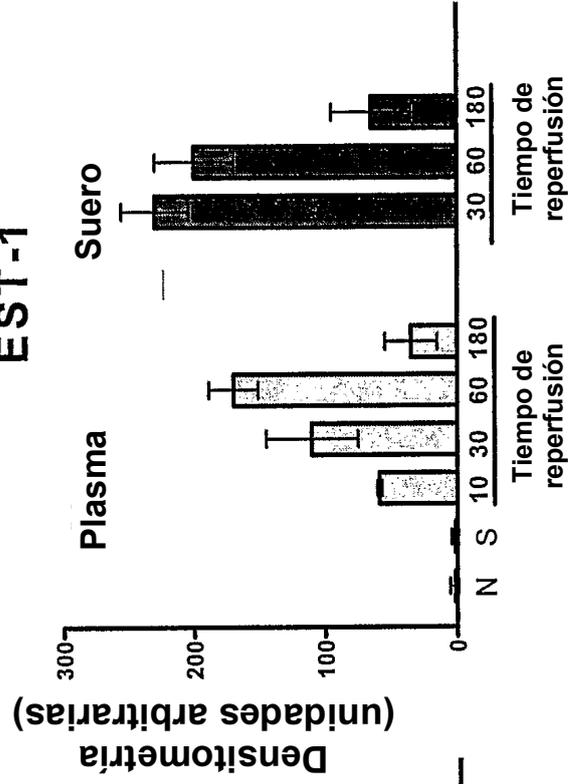


FIGURA 19D

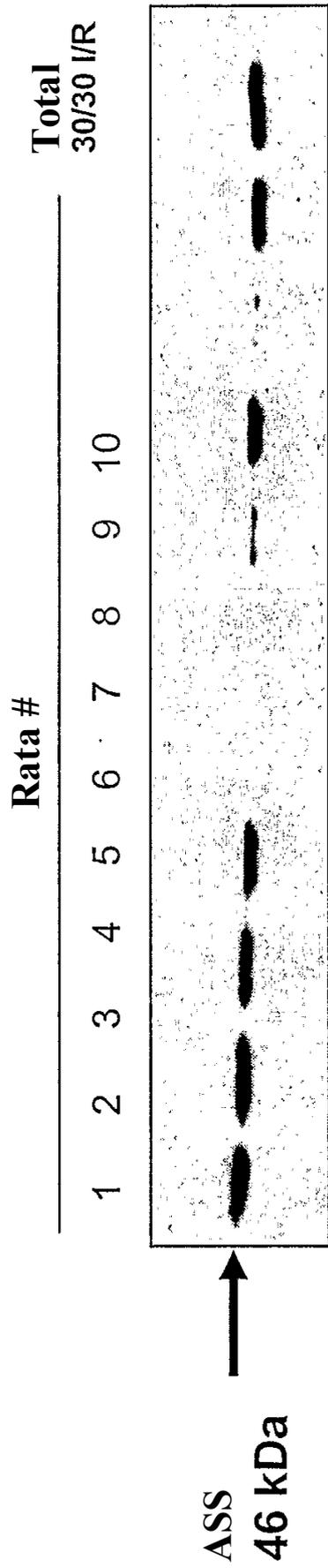


FIGURA 20

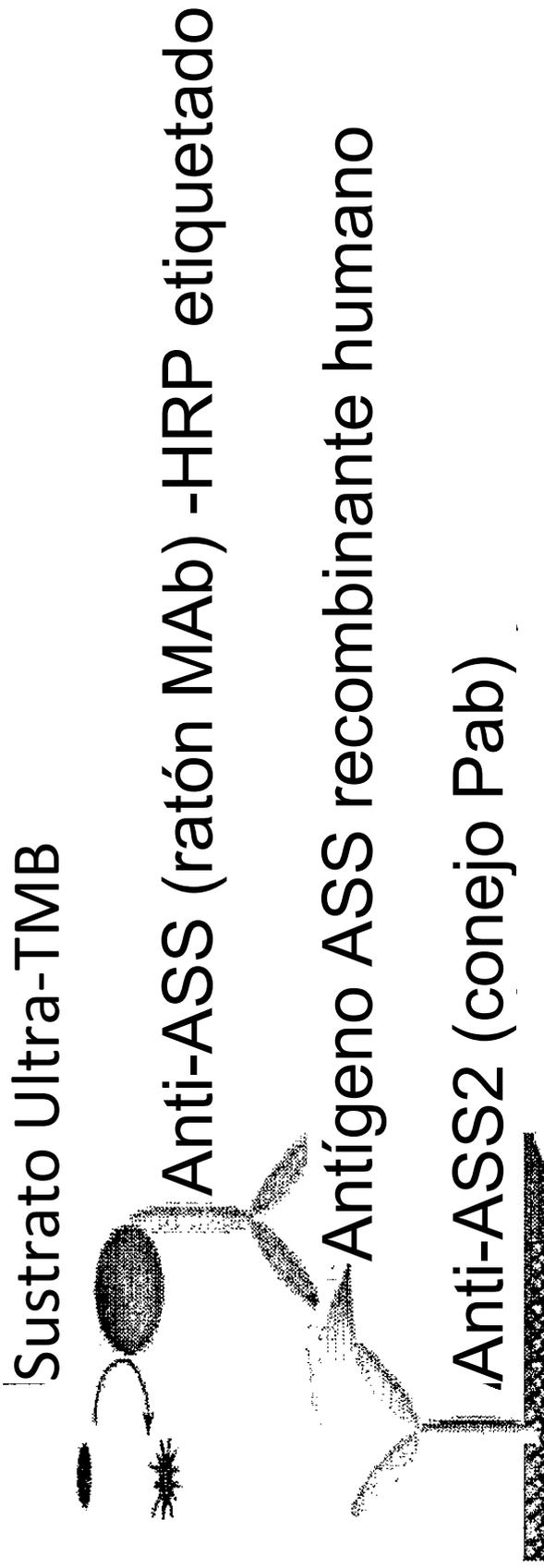


FIGURA 21

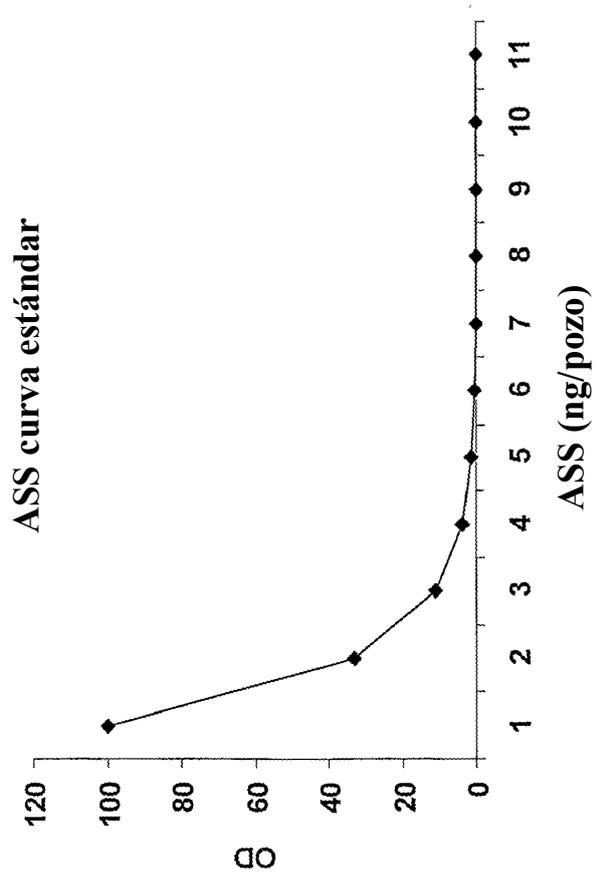


FIGURA 22A

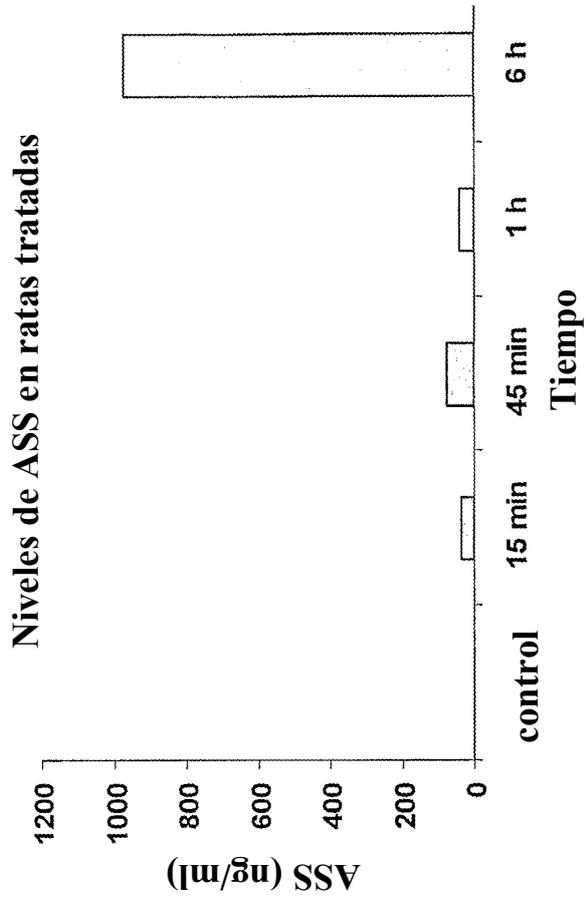


FIGURA 22B

Rata I / R muestras de suero sondadas con anticuerpo ASS2

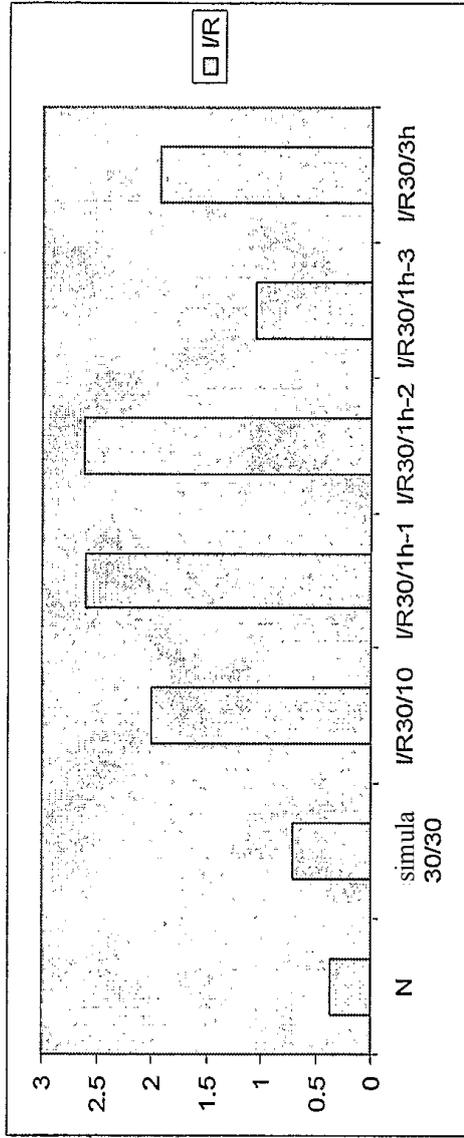


FIGURA 23A

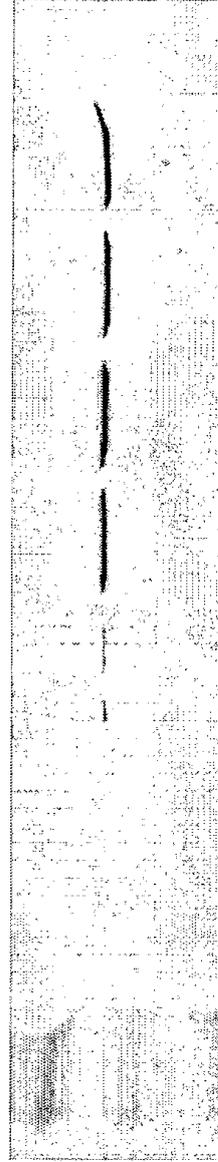


FIGURA 23B

PAT ⊕
 HC 1.
 HC 2.
 HC 3.
 P3-A
 P3-B
 P3-3'
 P3-30'
 P3-60'
 P4-B
 P4-A
 P4-30'
 P4-60'

PAT ⊕
 P2-B
 P2-A
 P2-3'
 P2-30'
 P2-60'
 P2-120'
 P2-A
 P2-31
 P2-60'
 P2-A
 P2-3'
 P2-30'
 P2-60'
 P2-120'
 P2-3'
 P2-30'
 P2-60'

ASS ⊕
 PAT ⊕
 P2-A
 P2-3'
 P2-30'
 P2-60'
 P2-120'
 P2-120'
 P2-B
 P2-3'
 P2-30'
 P2-60'
 P2-120'
 P2-120'
 P2-120'

PAT ⊕
 P5-B
 P5-A
 P5-3'
 P5-30'
 P5-60'
 P5-120'
 P5-B
 P5-A
 P5-3'
 P5-30'
 P5-60'
 P5-120'
 P6-B
 P6-A
 P6-3'
 P6-30'
 P6-60'
 P6-120'

FIGURA 24

ASS xFac

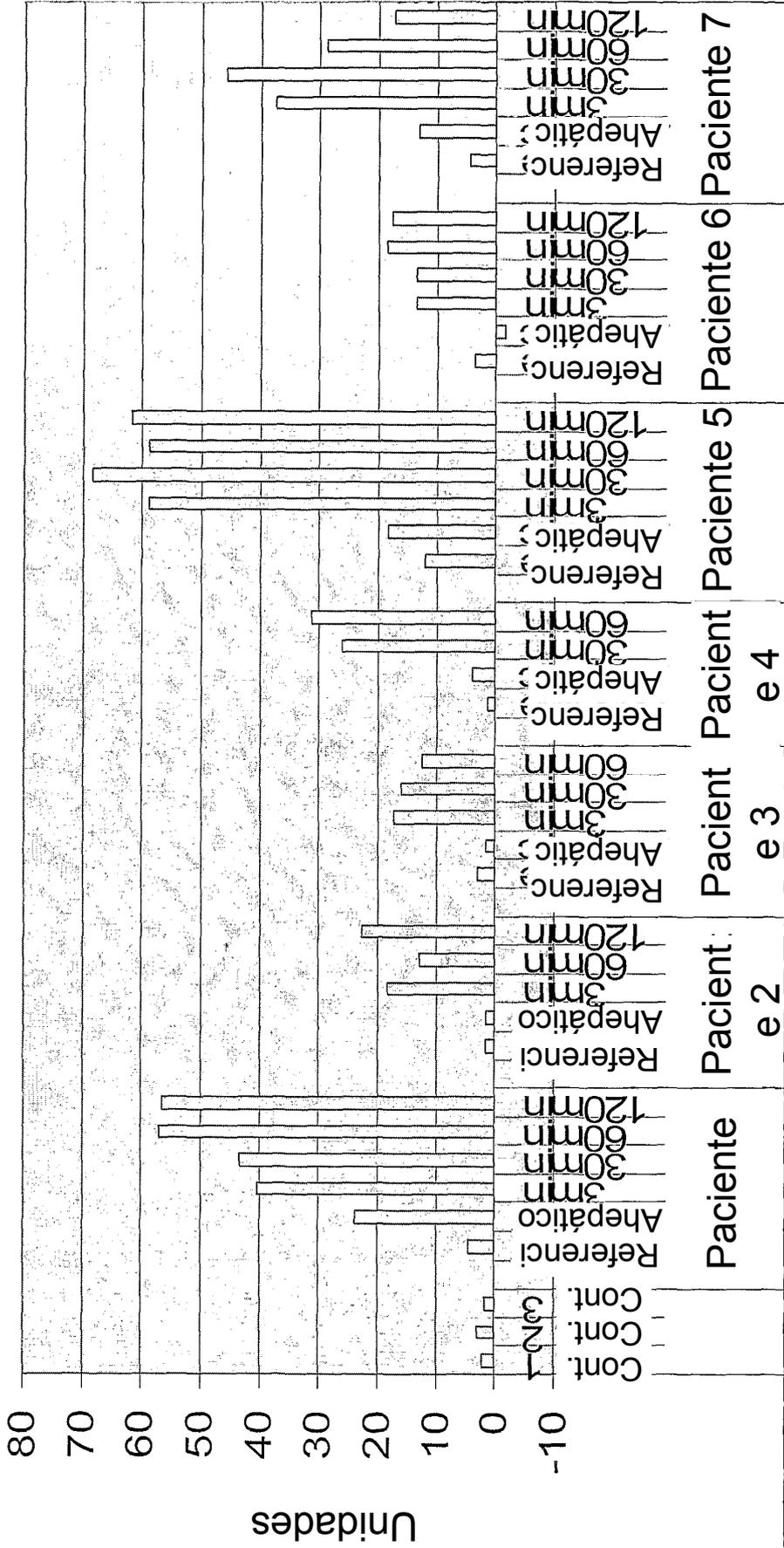


FIGURA 25

No	muestra	sobredosis	valor predicho (ng)
1	S3A	0,5398	33,3
	2S3B	0,2858	11,5
	3S3m1	2,1513	>100
	4S30	2,2721	>100
	5S60	2,2711	>100
	6S4A	0,5796	35,6'
	7S4B	0,4339	23,6
	8S430	2,7562	150
	9S460	2,8713	150
	10 HSTAB mio1	0,9153	63,1
	11 HS1BS1	0,5582	33,8
	12 HS 3m1	1,5022	111,3
	13 HS1 30min1	2,1874	>100
	14 HS1 60min1	2,2189	>100
	15 HS1 120min1	2,4606	>100
	16 HS2 Ahe PI	0,9717	67,8
	17 HS2 BS2	0,8652	59
	18 HS2 3m1	0,92	63,5
	19 HS2 60 min	1,465	108,2
	20 HS2 120 min1	1,5942	118,2
	21 P3 60	1,4534	107,3
	22 P4 30	1,2797	93
	23 P4 60	1,5434	114,7
	24 Control s2	0,156	0,82
	25 S2 45	0,1602	1,16
	26 S1 15	0,1876	3,4
	27 S1 45	0,1956	4,1
	28S1 6 h	1,3353	97,6
	29 S3 1 h	0,195	4

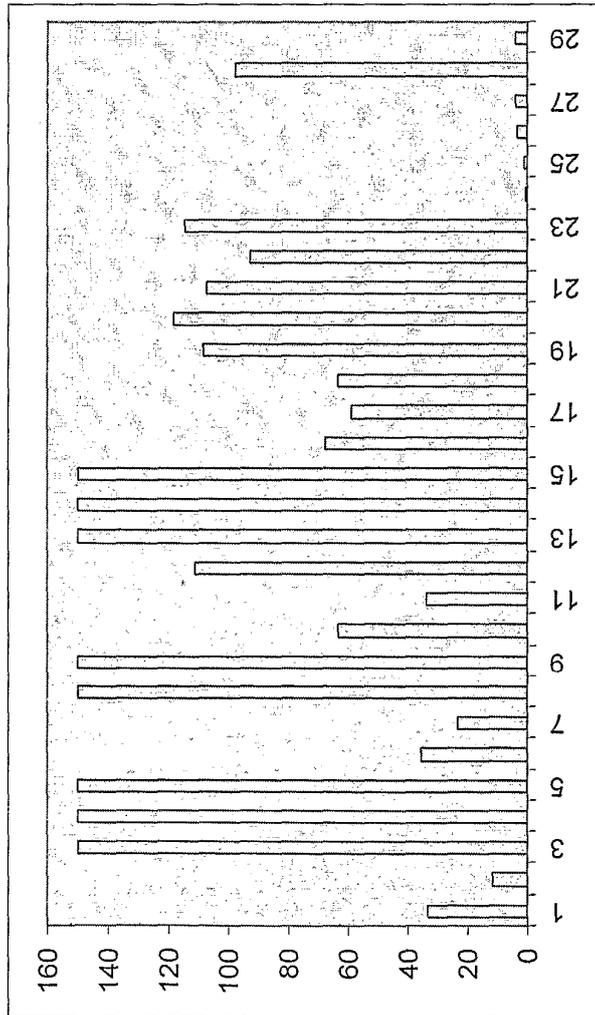


FIGURA 26

Estándar	sobredos	valor predicho	nombre de la	ng/5 ul
200 ng	1,362	18,401826	55-B	18,4
66,67 ng	0,772	86,532653	55-A	86,5
22,22 ng	0,434	Sin solución	55-3	>200
7,41 ng	0,318	Sin solución	55-30	>200
2,43 ng	0,269	Sin solución	55-60	>200
0,82 ng	0,255	Sin solución	55-120	>200
0,27 ng	0,231	5,8275790	56-B	5,83
0,091 ng	0,248	10,878177	56-A	10,8
0,03 ng	0,241	35,155879	56-3	35,1
0,01 ng	0,234	125,52675	56-30	125,5
0,0034	0,243	108,4418	56-60	108,4
0 ng	0,248	129,82847	56-120	129,8

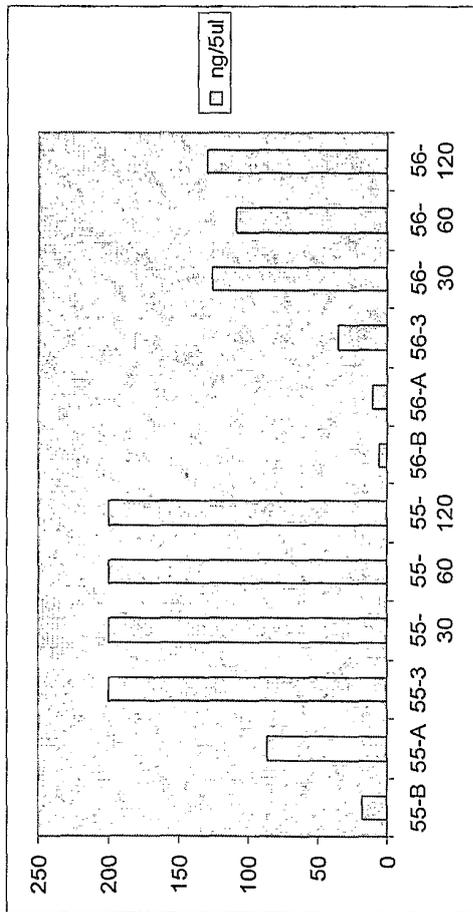


FIGURA 27

SWELISA usando muestras de hígado

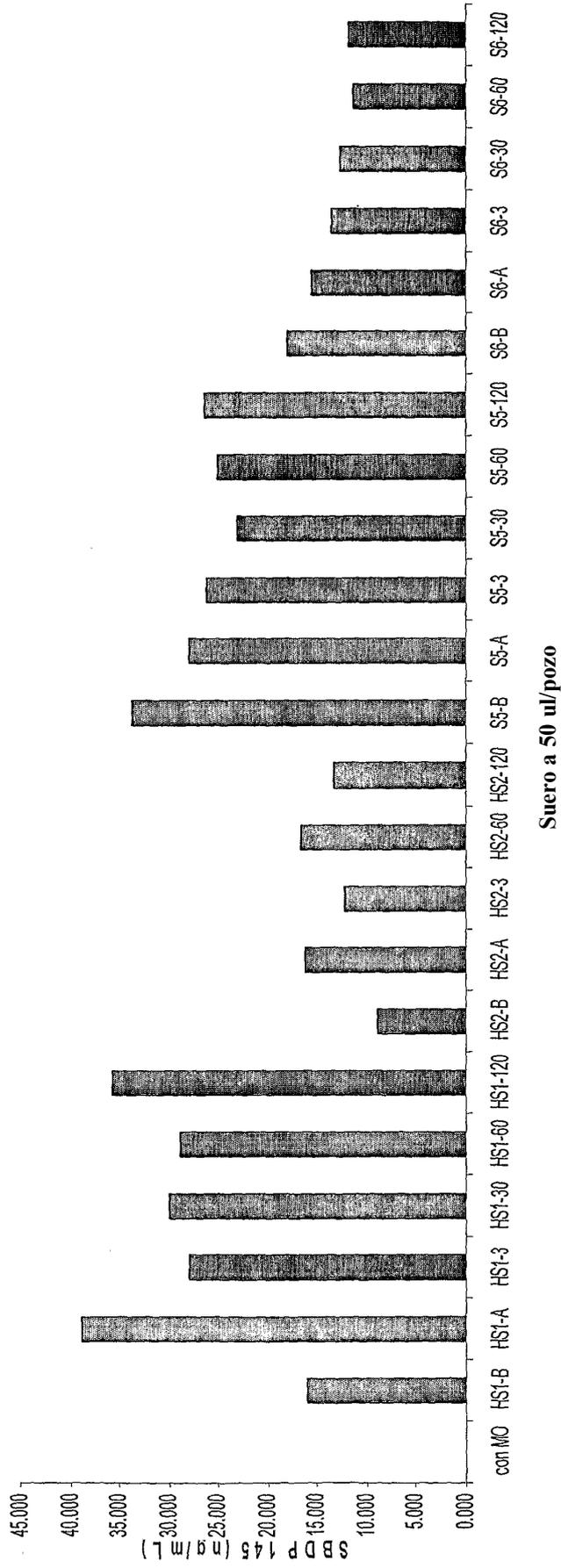


FIGURA 28

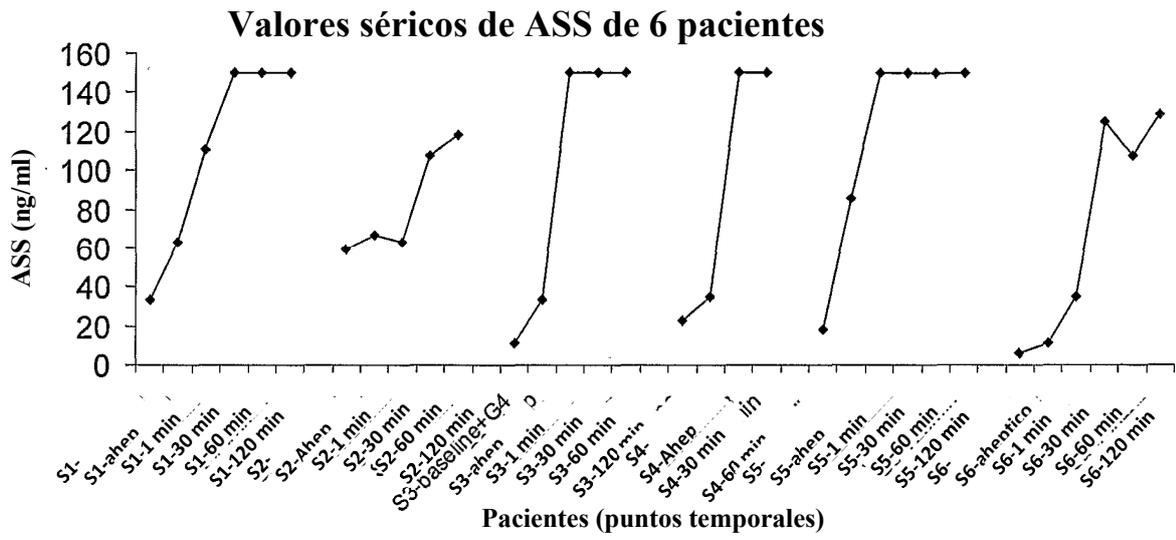


FIGURA 29