

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 543**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2006** E 15186776 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** EP 3056905

54 Título: **Diagnóstico de patología hepática a través de la evaluación del quinínogeno fucosilado**

30 Prioridad:

05.05.2005 US 677941 P

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**DREXEL UNIVERSITY (100.0%)
3141 Chestnut Street
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**BLOCK, TIMOTHY;
MEHTA, ANAND y
COMUNALE, MARY ANN**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

Observaciones:

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

ES 2 743 543 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

Diagnóstico de patología hepática a través de la evaluación del quinínogeno fucosilado

5 **Campo de la invención**

10 La invención se refiere, en general, al campo de los inmunodiagnósticos. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos y kits para el diagnóstico rápido y preciso de enfermedades hepáticas tales como carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangitis esclerosante primaria a través de la detección de quinínogeno fucosilado.

Antecedentes de la invención

15 El hígado es la glándula más grande del cuerpo y desempeña un papel vital, entre otras cosas, en la digestión, el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, el almacenamiento de vitaminas, minerales y carbohidratos, la producción de factores de coagulación de la sangre, destrucción de bacterias en la sangre y desintoxicación del cuerpo a partir de sustancias endógenas y exógenas. Dado el amplio espectro de funciones del hígado, las enfermedades y patologías del hígado pueden tener efectos sistémicos de gran alcance en el cuerpo.

20 Una patología hepática común es el carcinoma hepatocelular (HCC). HCC ocupa el quinto lugar entre los cánceres más comunes en el mundo, y es la tercera causa principal de muerte por cáncer (El-Serag H et al. (2001) *Hepatology* 33:62-5; y, Block T et al. (2003) *Oncogene* 22:5093-107). La etiología primaria para el HCC es la infección viral, particularmente, la infección con el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus de la hepatitis C (HCV) (Brecht C (1996) *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 10:335-73). El HCC puede provocar cirrosis hepática. Además, la cirrosis es un factor de riesgo para el HCC (Ikeda K et al. (1993) *Hepatology* 18:47-53).

30 La cirrosis hepática se caracteriza por, entre otras cosas, fibrosis extensa, necrosis de hepatocitos, colapso de la red de reticulina de soporte y depósito extenso de tejido conectivo. Existen múltiples etiologías para la cirrosis hepática, que incluyen hepatitis viral, abuso de alcohol, genética (por ejemplo, enfermedad de Wilson), trombosis venosas en el síndrome de Budd-Chiari y autoinmunidad (por ejemplo, cirrosis biliar primaria). La cirrosis hepática es irreversible y, si no se controla, puede provocar insuficiencia hepática, de hecho, la cirrosis hepática es una de las principales causas de muerte entre los adultos en los Estados Unidos y a nivel mundial.

35 Es muy importante que las enfermedades hepáticas tales como el HCC se detecten temprano para proporcionar al paciente la gama completa de opciones terapéuticas y, en última instancia, mejorar el pronóstico del paciente (Hoofnagle, JH et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336:347-56). Además, es igualmente importante que las afecciones que predisponen al HCC y otras enfermedades hepáticas, por ejemplo, cirrosis e infección por HBV y HCV, se detecten temprano para un tratamiento efectivo y para la prevención de la aparición de HCC. Desafortunadamente, muchas enfermedades hepáticas, incluidas la infección por HBV y HCV, pueden ser asintomáticas durante muchos años.

45 En general, las enfermedades hepáticas se diagnostican y controlan mediante pruebas serológicas y pruebas de función hepática, así como mediante examen físico del paciente. Además, como existe una correlación aparente entre la expresión elevada de alfa-fetoproteína (AFP) y la presencia de HCC, la detección de AFP a menudo se lleva a cabo de manera habitual en casos de sospecha de enfermedad hepática (Buamah PK et al. (1984) *Clin. Chim. Acta* 139:313-6). Sin embargo, la AFP sufre varios inconvenientes importantes en la medida en que puede expresarse en ausencia de enfermedad, lo que lleva a diagnósticos falsos positivos, y no se encuentra elevada en hasta el 50% de los casos de cáncer de hígado, lo que lleva a diagnósticos falsos negativos (Nguyen MH et al. (2002) *Hepatology* 36:410-7). Además, el valor predictivo de AFP disminuye sustancialmente con respecto a su capacidad para identificar HCC en etapa temprana (Oka H et al. (1994) *Hepatology* 19:61-7; Pateron D et al. (1994) *J. Hepatol.* 20:65-72; y, Zoli M et al (1996) *Cancer* 78:977-83).

55 Naitoh, A., et al. "Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma" (Fucosilación altamente mejorada de las glicoproteínas séricas en pacientes con carcinoma hepatocelular), *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (1999) 14, pp. 436-445, divulga que las especies reactivas a aglutinina *lens culinaris* de α -fetoproteína (AFP) fueron significativamente más altas que en la cirrosis hepática. Se concluyó que la combinación de mediciones de AFP fucosilada con alfa-1-antitripsina o transferrina fue útil para el diagnóstico de HCC.

60 Block, T.M., et al. "Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans" (Uso de glicoproteómicos dirigidos para identificar glicoproteínas séricas que se correlacionan con el cáncer de hígado en marmotas y seres humanos), *PNAS*, vol. 102, no. 3, págs. 779-794 (enero de 2005) divulga un procedimiento de análisis glicoproteómico en un intento de descubrir marcadores séricos que puedan ayudar en la detección temprana del cáncer de hígado inducido por el HBV. El procedimiento

demonstró que las marmotas diagnosticadas con carcinoma hepatocelular tienen niveles dramáticamente más altos de fucosa ligada a α -1,6 de núcleo asociada al suero en comparación con las marmotas sin un diagnóstico de HCC. Además, se descubrió que la Proteína 73 de Golgi estaba elevada e hiperfucosilada en animales con HCC y elevada en el suero de personas con diagnóstico de HCC.

Comunale, MA, et al., "Proteomic Analysis of Serum Associated Fucosylated Glycoproteins in the Development of Primary Hepatocellular Carcinoma" (Análisis proteómico de glicoproteínas fucosiladas asociadas al suero en el desarrollo de carcinoma hepatocelular primario), *Journal of Proteome Research*, 2006, 5, pp. 308-315, divulga que se puede observar un aumento en los niveles de fucosilación del núcleo a través del análisis de glicanos del suero total y que está asociado con el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Se descubrió que 19 proteínas estaban hiperfucosiladas en el cáncer. Se menciona el uso potencial de estas proteínas como biomarcadores.

Por lo tanto, se necesitan medios más rápidos, precisos y confiables para el diagnóstico de enfermedades hepáticas que sean mínimamente invasivos para el paciente, y que puedan administrarse de manera fácil y rentable a todos los pacientes con sospecha de tener una enfermedad hepática. Además, existe la necesidad de pruebas de diagnóstico que puedan detectar la presencia de la enfermedad en sus etapas incipientes o tempranas para facilitar el tratamiento profiláctico efectivo del paciente.

Sumario de la invención

La presente invención presenta procedimientos para diagnosticar patologías del hígado. En general, los procedimientos comprenden obtener una muestra de prueba, como un fluido biológico, de un sujeto con sospecha de tener una patología del hígado o del sistema biliar, detectar cuantificablemente la fucosilación en el quinínogeno en la muestra y luego comparar la fucosilación detectada con los valores de referencia para la fucosilación de quinínogeno. Los valores de referencia se establecen a partir de sujetos sin patología hepática o del sistema biliar y de sujetos con patologías hepáticas conocidas. Cualquiera o ambos valores de referencia se pueden comparar con los niveles de fucosilación detectados, y la comparación revelará la presencia o ausencia de la patología del hígado o del sistema biliar.

Los procedimientos de la invención pueden aplicarse para detectar carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangitis esclerosante primaria. El quinínogeno se puede utilizar como analito diana.

La detección puede proceder mediante cualquier ensayo adecuado en la técnica. El reactivo de detección puede marcar directamente los restos de glicosilo, por ejemplo, mediante productos químicos o colorantes específicos de carbohidratos, o mediante lectinas marcadas, proteínas de unión a carbohidratos marcadas o anticuerpos marcados. El reactivo de detección puede ser un reactivo secundario, por ejemplo, capturando primero el analito diana y luego poniendo en contacto el complejo diana reactivo de captura con un reactivo secundario marcado. La detección puede proceder separando los restos de glicosilo de las proteínas antes de la detección cuantificable de la fucosilación. La detección puede proceder separando las glicoproteínas de la muestra de prueba antes de la detección cuantificable de la fucosilación.

La invención puede emplear procedimientos novedosos para detectar proteínas glicosiladas en una muestra. Tales procedimientos comprenden poner en contacto una muestra con una lectina y detectar el complejo de proteína glicosilada con lectina. Las proteínas glicosiladas son proteínas fucosiladas. La lectina se puede acoplar directamente a un resto detectable, o la detección puede realizarse a través de un reactivo secundario que se une específicamente a la lectina, como un anticuerpo anti-lectina. Los procedimientos pueden comprender primero poner en contacto la muestra con un anticuerpo para capturar proteínas glicosiladas diana en la muestra, por ejemplo, un anticuerpo específico para las glicoproteínas ejemplificadas en la presente memoria.

También se divulgan kits para diagnosticar patologías del hígado o del sistema biliar. Los kits comprenden un reactivo que se une específicamente a restos de fucosilo. El reactivo puede marcarse con un resto detectable, o puede ser una sustancia química que marca específicamente los restos de fucosilo. Si el reactivo suministrado con los kits no está acoplado a un resto detectable, el kit puede comprender además un reactivo de detección que reconoce específicamente el complejo reactivo-glicoproteína, el reactivo de detección está acoplado a un resto detectable. Los kits incluyen además instrucciones para usar el kit en un procedimiento para diagnosticar una patología del hígado o del sistema biliar.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un ejemplo de glicofomas. Normalmente, las células hepáticas producen glicoproteínas que contienen la estructura de carbohidratos que se muestra en el panel A. Esto se conoce como un glicano bi-antenario (A2G2). En HCC, las células del hígado unen un residuo de fucosa a la cadena de glicano que da como resultado una glicoproteína fucosilada (glicofomo, referido con el prefijo Fc). El examen de todas las proteínas que tienen una cadena de carbohidratos específica se conoce como glicoproteómica dirigida. Las abreviaturas en la figura son las siguientes: N-acetilglucosamina (GlcNAc);

manosa (Man); galactosa (Gal); ácido siálico (NeuNAc); Fucosa (Fuc).

La Figura 2 muestra el nivel del glicano FcA2G2 en las personas en función del tiempo. (A) El nivel de la estructura FcA2G2 en un paciente antes (panel superior) o después (panel inferior) del diagnóstico de cáncer. Como muestra esta figura, el nivel de la estructura de FcA2G2 aumenta del 7,23% del grupo de glicano total a más del 13% del grupo de glicano total después del diagnóstico de cáncer. (B) Niveles de la estructura FcA2G2 en 8 individuos antes o después del diagnóstico de cáncer. En el gráfico, el eje Y es el porcentaje de la estructura FcA2G2 en cada individuo en función del glicano total liberado. El eje X es el número de muestra.

La Figura 3 muestra el diseño ELISA de Lectina utilizado para Fc-AFP y Fc-Quininógeno. Se usó el anticuerpo oxidado periodato como anticuerpo de captura y se determinó el nivel de proteína fucosilada mediante una lectina conjugada con fosfato alcalino (LcH) usando un sustrato colorimétrico (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolio (BCIP/NBT)).

La Figura 4 muestra un análisis de lectina de inmunoglobulinas humanas en pacientes con diversos grados de enfermedad hepática. Los ELISA de Lectina se realizaron como se describe en la Figura 3 y los Ejemplos, excepto que se utilizó la lectina AAL (lectina *aleuria aurantia*). Se usaron 5 µl de suero humano en el ensayo. Esta figura muestra un aumento en el nivel de inmunoglobulina fucosilada con un aumento de fibrosis. Las diferencias entre el grupo cirrótico y el sano, grupos en etapa 1 y 2 es estadísticamente significativo con un $p < 0,001$ según lo determinado por la prueba *t* de Student.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Se usan varios términos relacionados con los procedimientos y otros aspectos de la presente invención a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Dichos términos deben tener su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos específicamente definidos se deben interpretar de manera coherente con la definición proporcionada en la presente memoria.

Definiciones:

Las siguientes abreviaturas se pueden usar en la especificación y ejemplos: HAV, virus de la hepatitis A; HBV, virus de la hepatitis B; HCV, virus de la hepatitis C; HDV, virus de la hepatitis D; HEV, virus de la hepatitis E; HFV, virus de la hepatitis F; HGV, virus de la hepatitis G; AFP, alfafetoproteína; HCC, carcinoma hepatocelular; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; Fc, fucosilado.

Como se usa en la presente memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

El término "patología" significa cualquier afección que sea una desviación del estado normal o saludable.

El término "sistema biliar" se refiere a los órganos y al sistema de conductos que crean, transportan, almacenan y liberan bilis en el intestino delgado. El término abarca el hígado, la vesícula biliar y los conductos biliares: el conducto cístico, el conducto hepático, el conducto hepático común, el conducto biliar común y el conducto pancreático.

Las enfermedades y patologías del hígado o del sistema biliar abundan. Ejemplos no limitantes de enfermedades hepáticas o biliares incluyen el síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, hepatitis autoinmune, el síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, enfermedad de Byler, enfermedad de Caroli, colangiocarcinoma, el síndrome de Crigler-Najjar, hepatitis inducida por alcohol o drogas, síndrome de Dubin-Johnson, hígado graso/esteatosis, síndrome de Gilbert, hemangioma, hemohromatosis, virus de la hepatitis A, B, C, D, E y G, carcinoma hepatocelular, hiperbilirrubinemia, cirrosis biliar primaria, protoporfiria, síndrome de Rotor, colangitis esclerosante y enfermedad de Wilson.

Una patología hepática común es la cirrosis. La cirrosis hepática se caracteriza por, entre otras cosas, la formación generalizada de nódulos en el hígado, fibrosis extensa, necrosis de hepatocitos, colapso de la red de reticulina de soporte, deposición extensa de tejido conectivo, disminución del flujo sanguíneo a través del hígado, disminución de la secreción de bilirrubina, ictericia y la interrupción de las funciones bioquímicas hepáticas normales. Existen múltiples etiologías para la cirrosis hepática. Las causas más comunes incluyen el daño causado al hígado por la ingestión de alcohol, drogas o toxinas, especialmente en el caso de la enfermedad hepática alcohólica. La cirrosis también puede ser inducida por virus, por ejemplo, por diferentes cepas del virus de la hepatitis, hereditaria (por ejemplo, enfermedad de Wilson y hemocromatosis), inducida por una enfermedad crónica o la interrupción de los conductos biliares, por infecciones parasitarias (por ejemplo, esquistosomiasis), por exceso de absorción de hierro, por autoinmunidad (por ejemplo, cirrosis biliar primaria), o por inflamación del

hígado como resultado de la enfermedad del hígado graso, entre otros.

La "hepatitis" se refiere a cualquier inflamación clínicamente significativa del hígado o del sistema biliar, independientemente de su etiología. La "hepatitis aguda" se refiere a cualquier inflamación a corto plazo (menos de seis meses) o en la etapa inicial del hígado, como las etapas iniciales de la infección por el virus de la hepatitis. La "hepatitis crónica" se refiere a cualquier inflamación del hígado que persista durante seis meses o más. La "hepatitis infecciosa" se refiere a cualquier inflamación del hígado que puede transmitirse a otros. Usualmente, la hepatitis infecciosa es causada por un microorganismo como un virus (por ejemplo, HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HFV, HGV, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple (HSV) y virus Varicella-Zoster, etc.), bacterias, protozoos o levaduras. La "hepatitis no infecciosa" se refiere a cualquier inflamación del hígado que no se puede transmitir a otros, como la hepatitis alcohólica, la hepatitis autoinmune, la hepatitis tóxica/inducida por drogas y la hepatitis granulomatus, y similares.

El término "etiología" significa la causa u origen de una enfermedad, trastorno o patología.

Los "anticuerpos" tal como se usan en la presente memoria descriptiva incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), incluidos los productos de una biblioteca de expresión de Fab u otra inmunoglobulina. Con respecto a los anticuerpos, el término "inmunológicamente específico" o "específico" se refiere a anticuerpos que se unen a uno o más epítopos de una proteína de interés, pero que no reconocen y se unen sustancialmente a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas biológicas antigénicas. Los ensayos de detección para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo son bien conocidos y se practican habitualmente en la técnica. Para una discusión exhaustiva de tales ensayos, véase Harlow et al. (Eds.), ANTICUERPOS: UN MANUAL DE LABORATORIO; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, Nueva York (1988), Capítulo 6.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. "Polipéptido" se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por el gen. Los "polipéptidos" incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procedimientos naturales, tales como el procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte de un polipéptido, incluida la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procedimientos naturales postraducionales o pueden elaborarse por procedimientos sintéticos.

La "modificación postraduccional" se refiere a cualquier modificación química de un polipéptido después de que se produce. Comúnmente, una modificación posterior a la traducción implica unir al menos un resto a la cadena de polipéptidos, sin embargo, la modificación posterior a la traducción puede ser la escisión de la cadena de polipéptidos, el procesamiento proteolítico, la formación de enlaces disulfuro y similares. Los ejemplos no limitantes de modificaciones postraducionales incluyen glicosilación, fosforilación, acilación, acetilación, metilación, sulfonación, prenilación, isoprenilación, ubiquitinación, biotilación, formilación, citrulinación, miristolación, ribosilación, sumoilación, gamma carboxilación, ADP-ribosilación, amida ribosilación, amida ribosilación unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, oxidación, procesamiento proteolítico, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas como la arginilación, y similares. Véase, por ejemplo, Proteins - Structure and Molecular Properties (Proteínas: propiedades estructurales y moleculares), 2da Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993 y Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects (Modificaciones postraducionales de proteínas: perspectivas y prospectos), págs. 1-12 en la modificación covalente postraduccional de proteínas, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983; Seifter et al, (1990) Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors (Análisis para modificaciones de proteínas y cofactores no proteicos), Methods Enzymol. 182: 626-46 y Rattan et al. (1992) Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging (Síntesis de proteínas: modificaciones postraducionales y senescencia), Ann. NY Acad. Sci. 663: 48-62.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "glicosilación" se refiere a la unión química de al menos un

resto sacárido a una molécula tal como un polipéptido. La glicosilación puede estar n-enlazada u o-enlazada.

La "fucosilación" se refiere a la unión química de al menos un resto de fucosa a una molécula tal como una proteína. Un polipéptido "fucosilado" es un polipéptido con al menos un resto fucosa unido.

La "glicosilación del núcleo" se refiere a la adición de restos de glicosilo al núcleo de N-acetilglucosamina. "Fucosilación del núcleo" se refiere a la adición de un residuo de fucosa al núcleo de N-acetilglucosamina. Todas las estructuras de glicanos unidos a N tienen una estructura común, denominada núcleo, que contiene tres manosas y dos residuos de N-acetilglucosamina.

Un "glicofor" se refiere a un grupo de proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos idéntica pero que tienen restos de carbohidratos diferentes.

Se ha descubierto de acuerdo con la presente invención que existe una correlación con la incidencia de enfermedad hepática tal como el carcinoma hepatocelular y un aumento en el nivel de fucosilación del núcleo. El análisis del proteoma en suero de pacientes con enfermedad hepática reveló más de cincuenta glicoproteínas que demuestran un aumento de la fucosilación en relación con los controles sanos, lo que revela que el aumento de la fucosilación de proteínas es indicativo del estado de la enfermedad hepática. Por consiguiente, en un aspecto, la invención presenta procedimientos para diagnosticar una patología del hígado o sistema biliar en un paciente con sospecha de tener una patología del hígado o sistema biliar. Dichos procedimientos comprenden obtener una muestra de prueba de un paciente con sospecha de tener una patología del hígado, y detectar cuantificablemente la fucosilación en el quinínogeno en la muestra de prueba, en el que los niveles modulados de la fucosilación en relación con los valores de referencia para la fucosilación para tales quinínógenos indican la presencia o ausencia de una patología del hígado seleccionada de carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangitis esclerosante primaria.

Se puede obtener una muestra de prueba de cualquier lugar en un paciente en el que es probable que se encuentren proteínas fucosiladas indicativas de una afección del hígado. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de prueba de fluidos biológicos tales como lágrimas, saliva, mucosidad, sangre completa, suero, plasma, orina, bilis y similares. También se puede obtener una muestra de prueba de células o tejidos específicos, o de cualquier secreción o exudado. Por ejemplo, una biopsia de células o tejidos del hígado o del sistema biliar puede servir como muestra de prueba. Preferentemente, la muestra de prueba se obtiene de sangre periférica.

En una realización preferente, la detección de la fucosilación puede llevarse a cabo detectando un complejo polipéptido-resto. En otra realización preferente, la detección de la fucosilación se puede llevar a cabo separando el polipéptido y el resto, y detectando el resto.

La detección del complejo polipéptido-resto se puede llevar a cabo usando un reactivo que reconoce específicamente el resto, la clase particular de resto o el resto como un complejo con el polipéptido. Los reactivos de detección adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica, cuyos ejemplos no limitantes se describen a continuación. El reactivo puede comprender múltiples moléculas, cada una de las cuales tiene especificidad para un resto diana diferente, lo que da como resultado múltiples interacciones reactivo-diana.

Se pueden usar anticuerpos como reactivo. Cualquier anticuerpo que se una específicamente al resto diana de interés se puede usar en la presente invención. Se pueden usar anticuerpos monoclonales y/o policlonales, de cualquier fuente producida, al igual que los anticuerpos recombinantes como los anticuerpos de cadena sencilla y los anticuerpos exhibidos en fagos, así como los anticuerpos quiméricos y humanizados. También se pueden usar fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos tales como Fab o Fv.

En algunas realizaciones, los anticuerpos reconocen específicamente restos de fucosa. Se han descrito anticuerpos capaces de reconocer específicamente la fucosa. Véase, por ejemplo, Roy SS et al. (2002) Ann. Bot. 89:293-9; and, Srikrishna G et al. (1998) Glycobiology 8:799-811. Como alternativa, los anticuerpos también pueden elevarse a diversos restos, incluida la fucosa, y usarse en la invención. Los procedimientos para generar y purificar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Además, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier cantidad de técnicas conocidas en la técnica, incluida la técnica desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497.

Otras proteínas que tienen dominios de reconocimiento de carbohidratos también se pueden usar como reactivo en la presente invención. Se han descrito proteínas que tienen dominios de reconocimiento de carbohidratos, véase, por ejemplo, Bouyain S et al. (2002) J. Biol. Chem 277:22566-72 (proteína CG2958 de *drosophila melanogaster* que reconoce la fucosa).

En realizaciones particularmente preferentes, las lectinas se usan como reactivo. Las lectinas pueden obtenerse de cualquier organismo, incluidas plantas, animales, levaduras, bacterias, protozoos y similares. Las lectinas

purificadas están disponibles comercialmente, véase, por ejemplo, el catálogo Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las lectinas también pueden aislarse de su fuente natural, o expresarse y purificarse recombinantemente, por medios que son bien conocidos por los expertos en la técnica. La lectina puede, pero no necesita ser específica para un resto de carbohidrato particular. Se han descrito lectinas específicas de fucosa. Véase, por ejemplo, Mansour MH et al. (2005) *Immunobiology*. 210:335-48; Amano K et al. (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:2277-9; Loris R et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 331:861-70; and, Ishida H et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1002-8. Se contempla que las lectinas identificadas en el futuro son adecuadas para su uso en la presente invención.

Las proteínas con dominios similares a lectina también son adecuadas para su uso en la presente invención. Las proteínas con dominios similares a lectina se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Drickamer K (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:585-90.

Se pueden usar también alternativas a las lectinas basadas en ácidos nucleicos. Dichos reactivos, denominados aptámeros, aprovechan la enorme flexibilidad conformacional de los ácidos nucleicos monocatenarios. A partir de grandes conjuntos de ácidos nucleicos cortos aleatorizados, las moléculas individuales con altas afinidades por numerosos ligandos de ácido no nucleico se han aislado mediante selección iterativa. Las ventajas de los reactivos "lectámeros" de unión a glicanos son que es poco probable que los ADN lixiviados confundan o interfieran con los análisis posteriores. Los lectámeros pueden funcionar bajo condiciones de unión uniformes (pH, fuerza iónica). Los ácidos nucleicos sintéticos se pueden preparar en varias formas derivatizadas (por ejemplo, biotiniladas terminalmente). Los glicanos diana no están limitados por las especificidades de lectina existentes, ampliando sustancialmente el fraccionamiento y las capacidades analíticas existentes.

El quininógeno se puede usar en los ensayos de diagnóstico de la invención. Se contempla que las proteínas adicionales modificadas postraduccionalmente que se encuentran correlacionadas con una patología hepática se pueden usar en los procedimientos inventivos.

El reactivo puede marcarse directamente con un resto detectable. Como alternativa, se usa un reactivo secundario que reconoce específicamente el reactivo primario, que está marcado con un resto detectable. El reactivo secundario puede ser cualquier molécula, y es preferentemente un anticuerpo. El reactivo secundario está marcado con un resto detectable. Los restos detectables contemplados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, colorantes fluorescentes tales como fluoresceína, fiococitina, Cy-3, Cy5, alofocianina, DAPI, rojo Texas, rodamina, verde Oregon, amarillo lucifer y similares, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente naranja *Cerianthus*, fosfatasa alcalina, β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa, adenosina desaminasa, aminoglicósido fosfotransferasa (neo^r, G418¹ dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina quinasa, lacZ (que codifica α -galactosidasa) y xantina guanina fosforibosiltransferasa, beta-glucuronidasa, fosfatasa alcalina placentaria, fosfatasa alcalina embrionaria secretada, o luciferasa de luciérnaga o bacteriana. Las etiquetas enzimáticas se usan con sus sustratos afines. Al igual que con otros procedimientos estándar asociados con la práctica de la invención, los expertos en la técnica conocerán las etiquetas adicionales que se pueden usar. En algunas realizaciones, el reactivo o el reactivo secundario se acoplan a biotina y se ponen en contacto con avidina o estreptavidina que tiene una etiqueta de resto detectable.

En algunas realizaciones, el resto unido al polipéptido mediante modificación postraduccional puede marcarse y detectarse directamente, evitando así la necesidad de un reactivo etiquetado que reconozca específicamente un resto particular, así como cualquier necesidad de un reactivo secundario etiquetado. En algunas realizaciones, el resto unido al polipéptido por modificación postraduccional puede separarse del polipéptido y etiquetarse y detectarse directamente. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los carbohidratos y los restos de carbohidratos pueden etiquetarse directamente usando diversos procedimientos conocidos en la técnica. Los kits de etiquetado de carbohidratos y restos de carbohidratos están disponibles comercialmente. Los carbohidratos y restos de carbohidratos también se pueden biotinilizar y etiquetar con restos detectables conjugados con avidina o estreptavidina, tales como los descritos en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de reactivos que pueden etiquetar directamente a los oligosacáridos incluyen 2-aminobenzamida y ácido 2-aminobenzoico.

Los restos unidos postraduccionalmente se pueden separar de un polipéptido por cualquier medio adecuado en la técnica, incluyendo químicamente, por ejemplo, mediante tratamiento con hidrazina o ácidos tales como ácido fluorhídrico o ácido trifluorometanosulfónico, enzimáticamente, por ejemplo, mediante tratamiento con N-glicosidasa tal como PNGasa F, O-glicosidasa, endoglicosidasas o exoglicosidasas, o por medios físicos. Los kits disponibles comercialmente están disponibles para eliminar modificaciones postraduccionales, incluida la desglicosilación. Las bases químicas como la hidrazina o los reactivos químicos que conducen a reacciones de betaelinación también se pueden usar en reacciones de desglicosilación. Los expertos en la técnica apreciarán otras técnicas y reactivos, y se contempla que estén dentro del ámbito de la presente invención.

En algunas realizaciones, los restos separados se purifican antes del etiquetado o detección. Las técnicas de extracción en fase sólida o líquida, que son conocidas en la técnica, se pueden usar para purificar los restos separados para su posterior análisis.

Los valores de referencia pueden ser los establecidos para una patología hepática particular, o los establecidos para sujetos sanos, o ambos. Además, la presente invención contempla que la selección de muestras de prueba usando los procedimientos de la invención revelará proteínas adicionales modificadas postraduccionalmente, y el tipo y nivel particular de modificación postraduccional de dichas proteínas, que se correlacionan con el estado de la enfermedad o el estado sano. Con esta información, estas proteínas identificadas pueden servir como valores de referencia adicionales con los que se pueden comparar las muestras de prueba.

Se pueden usar una variedad de formatos de ensayo para llevar a cabo los procedimientos de la invención y para detectar cuantitativamente las modificaciones postraduccionales de las proteínas. Los inmunoensayos son un ensayo preferente e incluyen, entre otros, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos de competición, transferencia Western, ensayos de aglomeración de microesferas, inmunoensayos de flujo lateral, tiras reactivas inmunocromatográficas, tiras reactivas, inmunoensayos de formato migratorio y similares. Los expertos en la técnica conocerán otros inmunoensayos adecuados. La microscopía también se puede utilizar. En algunas realizaciones, la cromatografía es el ensayo preferente. Se prefiere particularmente la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), en algunas realizaciones, la espectroscopía de masas es el ensayo preferente, en algunas realizaciones, se utiliza electroforesis en gel junto con densitometría como ensayo.

El formato general de los ensayos implica poner en contacto el reactivo con una muestra de prueba que contiene los analitos de interés, a saber, el quinínogeno fucosilado, que puede distinguirse de otros componentes encontrados en la muestra. Después de la interacción del analito con el reactivo, el sistema puede lavarse y luego detectarse directamente o detectarse por medio de un reactivo secundario como se ejemplifica en la presente memoria.

En algunas realizaciones preferentes, el reactivo se inmoviliza sobre un soporte sólido. En otras realizaciones preferentes, la muestra de prueba, o las moléculas separadas o purificadas de la muestra de prueba, como los polipéptidos modificados postraduccionalmente, se inmovilizan sobre un soporte sólido. Las técnicas para la purificación de biomoléculas de muestras tales como células, tejidos o fluido biológico son bien conocidas en la técnica. La técnica elegida puede variar con el tejido o la muestra que se está examinando, pero está dentro de la habilidad de la técnica hacer coincidir el procedimiento de purificación apropiado con la fuente de la muestra de prueba.

Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio, plástico, metal, látex, caucho, cerámica, polímeros tales como polipropileno, difluoruro de polivinilideno, polietileno, poliestireno y poliacrilamida, dextrano, celulosa, nitrocelulosa, pvdF, nylon, amilasa y similares. Un soporte sólido puede ser plano, cóncavo o convexo, esférico, cilíndrico y similares, y puede ser partículas, cuentas, membranas, hebras, precipitados, geles, láminas, recipientes, pozos, capilaridades, películas, placas, portaobjetos y similares. El soporte sólido puede ser magnético o una columna.

Dado que las diversas modificaciones postraduccionales asociadas con la presencia de una patología hepática identificada hasta la fecha pueden estar presentes en niveles detectables en sujetos normales (aquellos sin patología hepática), puede ser necesario medir cuantitativamente los niveles de cada marcador siendo analizado en el ensayo de diagnóstico. En tales casos, la modulación de los niveles de las modificaciones relativas a los estándares/controles será indicativa de la presencia de una patología hepática. Los niveles de expresión normales de las diversas modificaciones pueden determinarse empíricamente de acuerdo con cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la técnica. Los niveles de expresión normales pueden servir como un estándar contra el cual se pueden comparar los niveles de expresión en pacientes con sospecha de patología hepática. La desviación significativa (positiva o negativa) sobre los niveles esperados de expresión normal de las modificaciones asociadas a la patología hepática es indicativa de la presencia de una patología hepática en el paciente. De manera similar, los niveles de expresión observados en pacientes con patología hepática confirmada también pueden servir como un estándar contra el cual se pueden comparar los niveles de expresión en pacientes con sospecha de patología hepática. Niveles similares de expresión de los marcadores asociados a la patología hepática entre el paciente conocido y el paciente sospechoso son indicativos de la presencia de una patología en el paciente. En tales casos, se espera que el nivel de expresión de las modificaciones en las muestras conocidas y sospechosas se desvíe significativamente del nivel de expresión presente en sujetos sanos.

Los presentes procedimientos tienen aplicabilidad para diagnosticar una patología hepática en cualquier animal. Preferentemente, los procedimientos se utilizan en mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, conejos, burros, ovejas, ratones y ratas. Lo más preferentemente, los procedimientos se utilizan en seres humanos.

También se divulgan dispositivos para diagnosticar una patología del hígado o sistema biliar en un paciente con sospecha de tener una patología del hígado. Los dispositivos comprenden un reactivo específico para un resto unido postraduccionalmente asociado con la presencia de una patología hepática, que preferentemente está

acoplada a un soporte sólido. Los dispositivos se pueden usar en cualquier ensayo, particularmente los descritos y ejemplificados en la presente memoria descriptiva, en el que el ensayo puede detectar cuantificablemente la presencia del resto asociado con una patología hepática, y en el que los niveles modulados de la expresión del resto en relación con un estándar indican la presencia de una patología del hígado.

5 Los reactivos para uso en los dispositivos pueden comprender una sola molécula que puede formar un complejo con una sola diana, o múltiples dianas, por ejemplo, una proteína de fusión multimérica con múltiples sitios de unión para diferentes dianas. El reactivo puede comprender múltiples moléculas, cada una de las cuales tiene especificidad para una diana diferente. En realizaciones preferentes, el reactivo está compuesto de proteínas. En algunas realizaciones preferentes, el reactivo es de anticuerpos, y cualquier anticuerpo que se una específicamente al marcador diana de interés se puede usar en los dispositivos. En algunas realizaciones preferentes, el reactivo está compuesto por dominios de reconocimiento de carbohidratos. En realizaciones altamente preferentes, el reactivo está compuesto de lectinas o proteínas con dominios de lectina, como se ejemplifica en la presente memoria.

15 El soporte sólido al que está acoplado el reactivo puede ser cualquier soporte sólido descrito en la presente memoria. El reactivo se puede inmovilizar en el soporte sólido por cualquier medio adecuado en la técnica, como adsorción, interacciones no covalentes como interacciones hidrofóbicas, interacciones hidrofílicas, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, interacciones electrostáticas, enlaces covalentes o mediante el uso de un agente de acoplamiento. Los agentes de acoplamiento incluyen glutaraldehído, formaldehído, diisocianato de hexametileno, diisotiocianato de hexametileno, N,N'-porinietilén bisiodoacetamida, N,N'-etilén bismaleimida, bissuccinimidil succinato de etilenglicol, bisdiazobenzidina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, N-succinimidil (4-yodoacetil)-aminobenzoato, N-succinimidil 4-(1-maleimidofenil)butirato, N-(epsilon-maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS), irinotolano, anhídrido S-acetilmercaptosuccínico, metil-3-(4'-ditiopiridil)propionimidato, metil-4-mercaptobutirilimidato, metil-3-mercaptopropionimidato, N-succinimidil-S-acetilmercaptoacetato, avidina, estreptavidina, biotina, proteína A de *Staphylococcus aureus* y similares.

30 Los sitios en el soporte sólido no acoplado con el reactivo de captura pueden bloquearse para evitar la unión no específica de moléculas marcadoras al soporte sólido. Los reactivos y procedimientos de bloqueo son bien conocidos en la técnica.

35 También se divulgan kits para diagnosticar la patología del hígado o sistema biliar. En una realización, los kits incluyen un reactivo que interactúa específicamente con restos de glicosilo e instrucciones para usar el kit en un procedimiento para diagnosticar la patología del hígado. El reactivo puede ser una molécula que marca directamente oligosacáridos como la 2-aminobenzamida, o puede ser una molécula que está acoplada a un resto detectable como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, los kits comprenden además un reactivo secundario que reconoce específicamente el reactivo primario, que está marcado con un resto detectable. Los kits también pueden incluir controles positivos y negativos.

45 En realizaciones preferentes, el reactivo está compuesto por anticuerpos, y cualquier anticuerpo que se una específicamente al resto de glicosilo de interés se puede usar en los dispositivos. En realizaciones más preferentes, el reactivo está compuesto por proteínas que pueden interactuar específicamente con carbohidratos. En realizaciones aún más preferentes, el reactivo está compuesto de lectinas. El resto glicosilo es fucosa.

50 En algunas realizaciones, los kits incluyen además un soporte sólido para inmovilizar el reactivo o el analito de la muestra de prueba aislada del paciente. El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido descrito en la presente memoria. El kit puede incluir además agentes de acoplamiento para facilitar la inmovilización del reactivo o analito al soporte sólido. En algunas realizaciones, el reactivo se proporciona previamente acoplado al soporte sólido.

Los kits pueden contener materiales suficientes para un ensayo, o pueden contener materiales suficientes para múltiples ensayos.

55 Se divulgan también procedimientos para detectar proteínas glicosiladas en una muestra. Dichos procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con una lectina para formar un complejo entre proteínas glicosiladas en la muestra y la lectina, y luego detectar el complejo glicosilado de proteína-lectina. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden poner en contacto la muestra con un anticuerpo para capturar proteínas glicosiladas en la muestra. El anticuerpo puede ser específico para una proteína particular, para un resto de glicosilo particular, o para un complejo de proteína-glicosilo particular. El anticuerpo se puede acoplar a un soporte sólido. La muestra se puede lavar y la lectina se aplica a la muestra lavada. La lectina puede acoplarse a un resto detectable, y detectarse directamente, o la lectina puede ponerse en contacto con un reactivo secundario acoplado a un resto detectable, por ejemplo, un anticuerpo anti-lectina, y luego detectarse.

65

Como se apreciará, los aspectos de la presente invención encuentran una gran utilidad en la evaluación de la presencia o ausencia de patologías hepáticas en seres humanos. Los expertos en la técnica también apreciarán que la presente invención se puede aplicar a animales, tanto con fines de pronóstico como de diagnóstico, para el seguimiento de la eficacia terapéutica o de otra manera análoga a los procedimientos útiles en seres humanos. Además, sin embargo, los aspectos de la presente invención se pueden usar para controlar el progreso de los estudios en animales en un entorno de investigación. Por lo tanto, la evaluación de la glicosilación en proteínas circulantes u otras en ratones, ratas, perros y otros animales puede informar a las personas que realizan investigaciones que involucran a dichos animales sobre el estado patológico de los hígados de dichos animales. De esta manera, por ejemplo, se puede evaluar la toxicidad de los productos farmacéuticos, aditivos, adyuvantes, químicos industriales o agrícolas propuestos o existentes o cualquiera de una amplia variedad de químicos, especies bioquímicas, contaminantes ambientales o industriales u otros materiales.

Se podrá apreciar que dicha evaluación de toxicidad es útil, por ejemplo, en ensayos farmacológicos preparatorios para presentaciones regulatorias. Además, la toxicidad de una gran cantidad de especies puede evaluarse de manera directa y conveniente. Además, es bien sabido que muchos productos farmacéuticos existentes, incluidas las estatinas, los agentes antineoplásicos y otros tienen una toxicidad hepática significativa. La toxicidad también es una preocupación cuando se abusa de las drogas o existe una sobredosis. La presente invención permite el monitoreo de dicha toxicidad en estas circunstancias para medicamentos farmacéuticos previos o posteriores a la aprobación o, de hecho, para medicamentos ilegales.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con más detalle. Su objetivo es ilustrar, no limitar la invención.

Ejemplo 1

Procedimientos experimentales generales

Análisis de glicanos. Se obtuvo suero de pacientes clínicamente diagnosticados como infectados con HBV crónico, y de pacientes clínicamente diagnosticados con HCC, pacientes clínicamente diagnosticados con cirrosis hepática y de sujetos de control sin evidencia de enfermedad hepática. Las muestras de suero se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

Se desnaturalizaron alícuotas de proteínas (1 mg/ml) con SDS al 1%, β -mercaptoetanol 50 mM durante 10 minutos a 100 °C. La solución se enfrió y se complementó con NP-40 a una concentración de 5,75%. Se añadió PNGasa F (ProZyme, San Leandro, CA) a una concentración final de 1 mU (IUB)/ μ l, y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa a la mezcla. La solución se incubó luego durante 24 horas a 37 °C. Los oligosacáridos separados de las proteínas en la muestra se recuperaron y purificaron mediante extracción en fase sólida usando una matriz de grafito poroso (LudgerClean H, Ludger Limited, Oxford, Reino Unido). Los oligosacáridos libres se marcaron con 2-aminobenzamida y se purificaron usando kits disponibles en el mercado (Ludger Limited, Reino Unido).

Los glicanos marcados con fluorescencia se analizaron posteriormente por HPLC usando una columna de fase normal (columna TSK amida 80). La fase móvil consistió en el solvente A (formiato de amonio 50 mM, pH 4,4) y el solvente B (acetonitrilo) y el gradiente utilizado fue el siguiente: gradiente lineal del 20-58% de solvente A a 0,4 ml/minuto durante 152 min, seguido por un gradiente lineal de 58-100% de solvente A durante los siguientes 3 min. La velocidad de flujo se incrementó a 1,0 ml/minuto y la columna se lavó en solvente A al 100% durante 5 minutos. Después de la etapa de lavado, la columna se equilibró en un 20% de solvente A durante 22 minutos en preparación para la siguiente muestra. El análisis de HPLC se realizó usando el sistema de HPLC Waters Alliance, complementado con un detector de fluorescencia Waters, y cuantificado usando el Millennium Chromatography Manager (Waters Corporation, Milford, MA). Las estructuras de glicano se identificaron por comparación con estándares conocidos y por digestión secuencial de exoglicosidasa.

Extracción y análisis de lectina. Las inmunoglobulinas se eliminaron de las muestras (medio y suero) usando una columna de Proteína A/G (Pierce, Rockford, IL) antes de la extracción de lectina. Las muestras se complementaron con una solución de unión a lectina, llevando la concentración final de la muestra a solución salina tamponada con Tris (TBS) 20 mM, cloruro de calcio 1 mM, cloruro de magnesio 1 mM y cloruro de manganeso 1 mM (pH 7,0). Las muestras se incubaron durante 16 horas a 4 °C con una serie de lectinas que reconocen fucosa unida a agarosa. Estas lectinas consistieron en *Lens culinaris* (LCH), *Pisum sativum sativum* (PSA) y *Vicia faba* (VFA) y reconocen las manosas ramificadas con el determinante de alfa fucosa (todos comprados en los laboratorios EY, San Mateo, CA). La incubación se realizó en un tubo de microcentrifuga antes de transferirla a una columna Costar de 0,45 μ M Spin-X (Corning, Acton, MA). La columna de lectina se lavó a fondo con solución de unión de lectina antes de que la fracción unida se eluyera usando los monosacáridos inhibidores apropiados (metil- α -D-glucopiranoósido 200 mM, α -metil-D-manopiranoósido 200 mM). Las fracciones unidas y no unidas se intercambiaron con tampón en TBS usando dispositivos Millipore YM-3Centricon y se sometieron a análisis de glicano o 2DE. Los niveles de proteína se monitorizaron en todas las extracciones.

Electroforesis en gel bidimensional. Las muestras se diluyeron en tampón (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4%, DTT 65 mM, TBP 5 mM y anfólitos al 0,4%), se agitaron periódicamente durante 1 hora y se aplicaron a una tira de 18 cm de pH3-10NL IPG (Amersham, Piscataway, NJ). La rehidratación en gel se llevó a cabo durante 14 horas a 50 V, y se enfocó usando el aparato IEF Protean (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA). Después del enfoque, las tiras de gel se redujeron en urea 6 M, SDS al 2%, DTT al 1,5%, glicerol al 30% y Tris 50 mM pH 6,8 durante 10 minutos y se alcalinizaron en urea 6 M, SDS al 2%, yodoacetamida al 3%, glicerol al 30% y Tris 50 mM pH 6,8. La segunda dimensión se resolvió con un gel de gradiente PDA de acrilamida al 8-18%-0,8% en una célula Protean II xi (Bio-Rad) con las condiciones de funcionamiento establecidas en 20 mA/gel durante 20 min y 40 mA/gel durante 4 horas con geles enfriados a 14 °C. Los geles se fijaron (EtOH al 30%/ácido fosfórico al 5%) y se tiñeron con una coloración azul brillante de Coomassie coloidal. Para todas las muestras, los geles se procesaron por cuadruplicado y solo las diferencias que fueron consistentes en todos los geles se consideraron significativas.

Imagenología y análisis en gel. Se tomaron imágenes digitales de los geles utilizando una cámara CCD enfriada de 16 bits (FluorChem 8000, Alpha Innotech, San Leandro, CA). Los archivos TIFF de las imágenes de gel se analizaron usando el paquete de software de imagenología en gel NonLinear Dynamics Progenesis Workstation (Nonlinear USA Inc., Durham, NC). Se delinearon las características del polipéptido en cada imagen de gel y luego el software determinó la intensidad total de píxeles dentro de cada característica (la intensidad integrada). Las características del polipéptido se normalizaron usando la intensidad integrada de cada característica y expresándola como un porcentaje de la suma de las intensidades integradas de todo el gel.

Espectrometría de masas. Análisis MALDI. Las manchas de proteína se cortaron a partir de geles coloidales colorados con azul de Coomassie, se tiñeron y se digirieron con tripsina. Los péptidos recuperados se concentraron y desalaron usando Zip Tip C18 (Millipore, Bedford, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se prepararon para la espectrometría de masas MALDI-TOF mezclando 0,5 µl de mezcla de péptidos con 0,5 µl de 10 mg/ml de ácido alfa-ciano 4-hidroxi cinámico, ácido fórmico al 1% en acetonitrilo al 50% y permitiendo que la gota se seque en la placa MALDI. Los mapas de masa de péptidos se obtuvieron usando un espectrómetro Voyager-DE ProMass (PE Biosystems, Foster City, CA) operado en modo de reflectrón de iones positivos. Las proteínas se identificaron a partir de los mapas de masa de péptidos utilizando la base de datos en línea MASCOT www.matrixscience.com para buscar en la base de datos de proteínas no redundantes.

Análisis LC MS/MS. La identificación de péptidos se realizó en un espectrómetro de masas con trampa de iones ThermoFinnigan LCQ (ThermoElectron Corporation, CA) equipado con HPLC microcapilar en línea (Eldex, Napa, CA) y una fuente de ionización por microspray que fue construida internamente. El microspray consiste en una columna microcapilar, picotip 360 X 75 µm, con una punta integrada de 15 µm (New objective, Woburn MA) autoempaquetada con resina Reliasil C18 (Column Engineering, Ontario, CA) hasta una longitud de 10 cm. Una parte alícuota de la muestra se cargó a través de una bomba de presión en una trampa de muestra capilar (Upchurch, WA) autoempaquetada con C18, y luego se colocó aguas arriba de la columna microcapilar. La HPLC está programada para producir un gradiente de 3 h (5% -65% B) a 30 µl/min. Antes de la trampa, la división del flujo pasivo se usa para reducir el flujo a ~500 nl/minuto. El tampón A consiste en 5% de acetonitrilo + 1% de ácido acético; el tampón B consiste en 90% de acetonitrilo + 1% de ácido acético. El LCQ se programó para realizar un escaneo completo de 450 a 2000 m/z, seguido de 3 escaneos MS/MS dependientes de datos configurados para elegir las especies de iones más abundantes del escaneo completo.

Análisis e interpretación de datos. Los datos de espectrometría de masas (espectros) se buscaron en la base de datos humana no redundante utilizando SeQuest (Thermo Electron Corporation). Los péptidos que puntúan por encima del valor umbral de 1,5 XCorr (individualmente)/2,0 XCorr (doble)/ 2,5 XCorr (triplemente) se verificaron manualmente. En todos los casos, los péptidos unidos deben contener el secuencia de glicosilación unido a N,N-X-S/T que se ha convertido en D-X-S/T por la acción de la enzima PNGasa F. Esto da como resultado una diferencia de masa de 0,9840 Da en comparación con la secuencia glicosilada.

Inmunotransferencia. Los volúmenes iguales de sueros de pacientes de suero total (0,5 µl/línea), no unidos a lectina (no unidos) o unidos a lectina (unidos) se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles de gradiente de poli(acrilamida) al 4-20%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF por inmunotransferencia. Las membranas se bloquearon incubando con un tampón de bloque de IX TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, cloruro de sodio 150 mM) se preparó con leche descremada al 5% y Tween 20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron las transferencias durante la noche con el anticuerpo deseado y se desarrollaron usando un sistema de detección quimioluminiscente ("ECL Plus", Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL). Las transferencias se visualizaron utilizando una cámara AlphaInnotech FluorChem CCD con el software de densitometría de punto AlphaEase (AlphaInnotech Corp., San Leandro, CA).

Ejemplo 2**La fucosilación del núcleo aumenta en el carcinoma hepatocelular**

Se desarrolló una metodología glicoproteómica dirigida que permite la identificación de biomarcadores de glicoproteína en suero. La metodología primero identifica los cambios en la glicosilación ligada a N que ocurren con la enfermedad. Estos cambios actúan como una etiqueta para que se puedan extraer proteínas específicas que contienen esa estructura de glicano. Los experimentos iniciales en un modelo animal revelaron una proteína, GP73, que es más sensible a la detección de HCC que los marcadores utilizados actualmente como AFP. En el modelo animal de HCC, el cambio en la glicosilación fue un aumento en la fucosilación del núcleo (Block et al. 2005). Este cambio también se observó en personas que desarrollaron HCC. Un ejemplo del aumento de la fucosilación se muestra en la Figura 2. Este conjunto de muestras constaba de 16 muestras de 8 pacientes en dos puntos de tiempo: antes del desarrollo del cáncer y después del diagnóstico de cáncer. En este caso, todos los pacientes clasificados como anteriores fueron diagnosticados clínicamente con cirrosis. Las muestras clasificadas como posteriores fueron diagnosticadas clínicamente con HCC por ultrasonido y biopsia. Como muestra esta figura, los pacientes antes del diagnóstico de HCC tienen niveles mucho más bajos del núcleo de glicano bi-antenario fucosilado (FcA2G2) en comparación con después del diagnóstico de HCC. Por ejemplo, el paciente 121 tenía 7,23% del glicano FcA2G2 antes del diagnóstico de HCC y 13,2% después del diagnóstico de HCC. Como se puede apreciar en la Figura 2B, esta tendencia al alza fue cierta en todos los pacientes examinados. Estos resultados resaltan el hecho de que los niveles incrementados de fucosilación del núcleo unido a-1,6 están asociados con el desarrollo de HCC. Esto es cierto en muestras que fueron AFP positivas (> 20 ng/ML) o AFP negativas. Es decir, como se muestra en la Figura 2B, los pacientes 965, 370, 842, 999 y 978 eran todos AFP negativos, pero tenían niveles aumentados de glicano FcA2G2. Para todos los pacientes examinados hasta el momento, aquellos que son normales, tienen hepatitis activa o tienen cirrosis tenían un promedio de 8,44% +/- 0,75 (n = 19) del núcleo de glicano fucosilado, mientras que aquellos pacientes diagnosticados con HCC tenían un promedio de 12,5% +/- 1,83 (n = 17) del núcleo de glicano fucosilado. Esta diferencia fue estadísticamente diferente con un valor P de 0,001.

Ejemplo 3**Identificación de glicoproteínas fucosiladas en el carcinoma hepatocelular**

Como el nivel de fucosilación se incrementó en pacientes con HCC, era imperativo determinar aquellas proteínas que habían aumentado la fucosilación. Por lo tanto, las glicoproteínas fucosiladas asociadas con sueros de individuos agrupados normales o positivos para HCC agrupados se extrajeron usando lectinas y el proteoma se analizó mediante electroforesis en gel bidimensional (2DE) o mediante una metodología simple basada en LC MS/MS. Usando estas metodologías, se observó que las glicoproteínas tales como la glicoproteína ácida α -1-fucosilada (Fc), Fc-ceruloplasmina, Fc- α -2-macroglobulina, Fc-hemopexina, Fc-Apo-D, Fc-HBsAg y Fc-Quinínógeno aumentó en pacientes con HCC, mientras que los niveles de Fc-haptoglobina disminuyeron en esos pacientes (Tabla 1). Curiosamente, también se encontraron varias moléculas de inmunoglobulina (IgG, IgA e IgM) en el proteoma fucosilado de aquellos pacientes con cáncer. Sin embargo, un análisis posterior ha demostrado que estas proteínas se fucosilan principalmente en la cirrosis y no solo en el cáncer (Figura 4).

Tabla 1. Proteínas identificadas como alteradas en pacientes con HCC

Fc-GP-73
Fc-hemopexina
Fc-HBsAg
Partícula viral de Fc-hepatitis B
Fc-alfa-ácido-glicoproteína
Fc-alfa-1-antiquimotripsina (incluyendo Fc-Alfa-1- antiquimotripsina His-Pro-less)
Fc-alfa-1-antitripsina
Fc-Serotransferrina
Fc-Ceruloplasmina
Fc-alfa-2-macroglobulina
Fc-alfa-2-HS-glicoproteína (Fetuin A)
Fc-Haptoglobina

ES 2 743 543 T3

	Precursor de la cadena gamma de Fc-fibrinógeno
	Fc-IgG
5	Fc-IgA
	Fc-APO-D
	Fc-IgM
10	Fc-Quininógeno
	Glicoproteína rica en histidina Fc
	Precursor del factor 1 del complemento Fc (incluida la cadena pesada del factor I del complemento Fc)
15	Cadena ligera del factor I del Complemento Fc
	Componente C1s del Complemento Fc
	Precursor del factor B del complemento Fc (incluido el fragmento Ba del factor B del complemento y el fragmento Bb del factor B del complemento Fc)
20	Precursor del Complemento Fc C3 (incluida la cadena beta del Complemento Fc C3)
	Cadena alfa del Complemento Fc C3
25	Fc-C3a anafilatoxina
	Complemento Fc
	Cadena C3b alfa'
30	Fragmento C3c del Complemento Fc
	Fragmento C3dg del Complemento Fc
	Fragmento C3g del Complemento Fc
35	Fragmento C3d del Complemento Fc y Fragmento C3f del Complemento Fc
	Complemento Fc C5 (incluida la cadena beta del Complemento Fc C5)
40	Cadena alfa del Complemento Fc C5
	Fc-C5a anafilatoxina
	Cadena alfa' del Complemento Fc C5
45	Complemento Fc C7
	Glicoproteína Fc-alfa-1B
	Fc-B-2-glicoproteína (apo H)
50	Proteína de unión a Fc-vitamina D
	Fc-Inter-alfa-tripsina inhibidor de la cadena pesada H2
	Alfa-1B-glicoproteína
55	Precursor Fc-angiotensinógeno
	Fc-angiotensina-1
60	Fc-angiotensina-2
	Fc-angiotensina-3
	Proteína Fc-GARP

	Fc-beta-2-glicoproteína
	Fc-Clusterina (Apo J)
5	Glicoproteína precursora de Integrina alfa-8 (incluida la cadena pesada de Fc-Integrina alfa-8 y la cadena ligera de Fc-Integrina alfa-8)
	Partícula viral de Fc-hepatitis C
10	Precursor de la proteína 32 que contiene repeticiones ricas en leucina Fc

Ejemplo 4

Los niveles de Fc-GP73 y Fc-hemopexina aumentan en pacientes con carcinoma hepatocelular inducido por hepatitis B

El nivel de Fc-GP73 y Fc-hemopexina se examinó en una pequeña cohorte de pacientes cegados (de nuestro colaborador Dr. Chau-Ting Yeh, Director, Laboratorio central digestivo y equipo de investigación de Hepatoma, Unidad de Investigación del Hígado, Chang Gung Memorial Hosp., Taiwán) que contiene un total de 80 pacientes con diversos grados de enfermedad hepática (Tabla 2). El análisis de estas muestras se realizó para el nivel total de GP73, para el nivel de GP-73 fucosilada (Fc-GP73), y para el nivel de hemopexina fucosilada (Fc-hemopexina). El GP73 total se analizó por inmunotransferencia usando suero completo. Las especies fucosiladas se analizaron mediante extracción con lectina de 5 µl de suero (LCH) seguido de inmunotransferencia de la fracción fucosilada e imágenes usando una cámara AlphaInnotech FluorChem CCD con software de densitometría de punto AlphaEase. La sensibilidad, la especificidad y los valores positivos para estos tres marcadores se presentan en la Tabla 3. Como se muestra en esta figura, utilizando un límite de 5 veces mayor que el total de suero sano comprado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) GP73 tenía una sensibilidad del 65% y una especificidad del 90%, que era muy similar a nuestro estudio ciego más amplio con este marcador (Marrero et al. (2005) J. Hepatol. 43: 1007-12); 69% de sensibilidad y 86% de especificidad). Incluso más prometedores que el GP73 total fueron Fc-GP73 y Fc-hemopexina. Fc-GP73 tenía una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% (usando un límite de 100 veces mayor que el suero sano comprado (Sigma Chemical Co), mientras que la hemopexina Fc tenía una sensibilidad del 95% y una especificidad de 100% (usando un límite de 20 veces mayor que el suero sano comprado (Sigma Chemical Co.).

Tabla 2. Muestras utilizadas para comparar el valor predictivo de los marcadores en la enfermedad hepática inducida por el HBV

Grupo	Estado Clínico*	Número	Intervalo de Edad
1	Sujetos sanos	20	21-64
2	HBV +, inactivo (portador)	20	26-70
3	HBV +, activo (cirrosis)	20	22-68
4	HBV infectado, HCC	20	25-81
Suero Sigma	Suero comercialmente disponible	1	desconocido

* el estado clínico se determinó por falta de HBsAg (grupo 1), presencia de HBsAg (grupo 2), presencia de HBsAg junto con biopsia para confirmar la cirrosis (grupo 3) o presencia de HBsAg junto con el diagnóstico de HCC por MRI (grupo 4)

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo de GP73 total, Fc-GP73 y hemopexina Fc en los pacientes que se muestran en la Tabla 2

Marcador	Sensibilidad	Especificidad	PPV
GP73 total	65%	90%	77%
Fc-GP73*	90%	100%	100%
Fc-hemopexina*	95%	100%	100%

* El análisis de Fc-GP73 y Fc-hemopexina se realizó mediante inmunotransferencia después del agotamiento de Ig y la extracción de lectina.

Ejemplo 5**ELISA de Lectina para Fc-AFP y Fc-Quininógeno**

El análisis de GP73 fucosilado y hemopexina fucosilada en la Tabla 3 se realizó por inmunotransferencia del proteoma fucosilado. Esto requirió la extracción de inmunoglobulina y extracción de lectina de cada muestra. Como esto es bastante laborioso, se desarrolló un ELISA de Lectina para permitir un rendimiento mucho mayor (ver Figura 3). Los experimentos iniciales se centraron en el desarrollo de un ELISA de Lectina para Fc-AFP. Se sabe que la AFP está fucosilada y varios informes en la literatura estaban disponibles para permitir la comparación (Naitoh et al. (1999) J. Gastroenterol. Hepatol. 14:436-45). Para el desarrollo del ensayo, se utilizó un conjunto de muestras seleccionado de 60 pacientes como se describió previamente (Marrero et al. (2005) J. Hepatol. 43:1007-12). 20 pacientes se infectaron con HCV, pero por lo demás se consideraron sanos, 20 pacientes se infectaron con HCV y se les diagnosticó cirrosis, y 20 pacientes se infectaron con HCV y se les diagnosticó HCC. Las muestras en este conjunto fueron elegidas para incluir a muchos individuos AFP+. Además, se utilizó suero humano (Sigma Chemical Co.) como control con el que se compararon todos los demás grupos de pacientes. A modo de resumen, se diluyen 50 µl de suero humano en 150 µl de tampón de unión a lectina (Tris 20 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y cloruro de MoCl₂ 1 mM, pH 7,0) y se agrega directamente a los Tubos de Bloqueo Heterofílicos antes de la adición a las placas para 2 horas a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron 10 veces con Tween 20 al 2% en tampón de unión de lectina antes de que se añadiera la lectina. Las glicofomas fucosiladas se detectaron con una lente marcada con biotina *Lens Culinaris* o *Aleuria aurantia* (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La lectina se detectó utilizando un sistema de estreptavidina marcado con fluoresceína y posteriormente, las muestras se midieron en el lector de placas de fluorescencia Cytofluor 4000 (MTX Lab Systems, Inc. Vienna, Va) a la longitud de onda apropiada. La intensidad fluorescente relativa en cada muestra se comparó con la observada en el suero normal adquirido. La Tabla 4 muestra los resultados del análisis con Fc-AFP. En este conjunto de muestras, utilizando un límite de 5 veces mayor que el suero sano comprado (Sigma Chemical Co.), Fc-AFP tenía una sensibilidad del 70%, una especificidad del 90% y un valor predictivo positivo (PPV) de 91%. Esto es consistente con lo que se ha informado con Fc-AFP (Naitoh et al. (1999) J. Gastroenterol. Hepatol. 14:436-45). En este mismo conjunto de muestras, el AFP total tenía una sensibilidad del 70%, una especificidad del 70% y un PPV del 77% (utilizando un límite de 20 ng/ml). Usando el mismo conjunto de muestras, se analizó el Fc-quininógeno usando la misma metodología que para AFP. El Fc-Quininógeno se identificó en el análisis proteómico como presente en las muestras de cáncer y se utilizó inicialmente ya que el anticuerpo estaba fácilmente disponible. Como se muestra en la Tabla 4, el Fc-quininógeno tenía una sensibilidad del 80%, una especificidad del 95% y un PPV del 95% (utilizando un límite de 3 veces mayor que el suero sano adquirido (Sigma Chemical Co).

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad y PPV para AFP total, AFP fucosilado y quininógeno fucosilado según lo determinado por ELISA de Lectina

Marcador	Sensibilidad	Especificidad	PPV
AFP	70%	70%	77%
Fc-AFP	70%	90%	91%
Fc-Quininógeno	80%	95%	95%

Ejemplo 6**Las inmunoglobulinas humanas se fucosilan con el desarrollo de cirrosis**

Como se muestra en la Tabla 1, se han identificado más de 50 glicoproteínas que han alterado la glicosilación en función de la enfermedad hepática. Aunque el aumento en muchas de estas glicoproteínas fucosiladas se correlaciona con el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC), se descubrió que algunas de estas glicoproteínas también se alteran con otras enfermedades hepáticas. Por ejemplo, se observó que las inmunoglobulinas humanas se hiperfucosilan con el desarrollo de cirrosis hepática. Dado que se determinó que la IgG era la principal fuente de proteína fucosilada en el suero de las personas con cirrosis, en el pequeño conjunto inicial de muestras, se razonó que el nivel de IgG fucosilada podría correlacionarse con un diagnóstico de cirrosis. Además, en base a los resultados mostrados en la Figura 3 y la Tabla 4, parecía que podría desarrollarse un ensayo simple basado en lectina para detectar IgG fucosilada.

A modo de resumen, se detectó IgG fucosilada incubando 5 µl de suero con pocillos recubiertos con IgG antihumana de ratón oxidada con periodato durante 2 horas. Posteriormente se detectó IgG humana fucosilada por incubación con lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) biotinilada. La lectina unida se detectó utilizando ESTREPTAVIDINA Conjugada con RDye™ 800 y la intensidad de la señal se midió utilizando el Sistema de Imagen Infrarroja Odyssey® (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska). En todos los casos, la intensidad de la muestra se comparó con el suero humano adquirido comercialmente (Sigma Chemical Co.).

Usando este ensayo, se determinó la cantidad relativa de IgG fucosilada en más de 200 muestras de suero de pacientes normales, o aquellos con diversos grados de enfermedad hepática. Además, se examinaron pacientes con enfermedades no hepáticas. Es importante tener en cuenta que el operador del análisis de detección de IgG fucosilada no estaba al tanto del diagnóstico asociado con la muestra de suero, en el momento de la prueba. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Los resultados se expresan como un aumento de veces sobre sigma. La señal detectada en las muestras de los 70 sujetos sanos (sin evidencia de HBV, HCV o enfermedad hepática) fue consistentemente baja, menos de 2 veces la observada en suero adquirido comercialmente. Por el contrario, todos los pacientes con cirrosis tenían valores superiores a 2 veces por encima del suero comprado comercialmente. El nivel medio de aumento fue 13 veces superior al suero adquirido comercialmente. Los pacientes infectados por el HCV con niveles variables de fibrosis también tenían niveles elevados de IgG fucosilada. Curiosamente, el nivel de IgG fucosilada varió en estos pacientes según el nivel de fibrosis. Aquellos pacientes con fibrosis en etapa 0-2 tuvieron un aumento medio de 3 veces en la IgG fucosilada, mientras que aquellos pacientes con fibrosis en etapa 4 o mayor tuvieron un aumento medio de 13 veces en la IgG fucosilada. Usando un punto de corte de 5 veces por encima del suero humano adquirido comercialmente, este ensayo tenía una sensibilidad del 92%, una especificidad del 96% en la diferenciación de la fibrosis en etapa 1-2 de la fibrosis/cirrosis en etapa 3-6. El valor predictivo positivo fue del 92% y el valor predictivo negativo fue del 96%.

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es capaz de variación y modificación dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para evaluar una patología hepática de un sujeto seleccionada entre carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangitis esclerosante primaria, usando una muestra biológica de dicho sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- 10 cuantificar proteína fucosilada en o desde dicha muestra biológica, en el que dicha proteína es quinínogeno,
 y,
- 15 comparar el valor cuantificado de proteína fucosilada con un valor de referencia de fucosilación para dicha proteína en o desde una muestra biológica comparable con el fin de determinar la presencia o ausencia de una de dichas patologías hepáticas seleccionadas de carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y colangitis esclerosante primaria, en dicho sujeto.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende poner en contacto dicha proteína en o desde dicha muestra biológica con una lectina de unión a fucosa, y permitir que dicha lectina se una a dicha proteína;
- 25 detectar cuantificablemente dicha lectina unida para obtener un valor de lectina unida detectada; y
- comparar el valor de lectina unida detectada con un valor de referencia para la unión de lectina en dicha proteína en o desde una muestra biológica comparable de sujetos sin dicha patología hepática, siendo dicho valor de lectina unida detectada en relación con el valor de referencia, indicativo de la presencia o ausencia de dicha patología hepática, en el que un valor de lectina detectada que muestra una desviación significativa de dicho valor de referencia es indicativo de la presencia de dicha patología hepática, o
- 30 comparar el valor de lectina unida detectada con un valor de referencia para la unión de lectina en dicha proteína en o desde una muestra biológica comparable de sujetos en los que se sabe que dicha patología hepática está presente, siendo dicho valor de lectina unida detectada en relación con el valor de referencia, indicativo de la presencia o ausencia de dicha patología hepática, en el que un valor de lectina detectada que muestra una desviación significativa de dicho valor de referencia es indicativo de la ausencia de dicha patología hepática.
- 35 3. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 2, en el que la lectina de unión a fucosa se acopla a un resto detectable.
- 40 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha patología hepática es carcinoma hepatocelular.
- 45 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha patología hepática es colangiocarcinoma.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha patología hepática es colangitis esclerosante.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es sangre completa, suero, orina, saliva, lágrimas o mucosas.
- 50 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además separar dicha proteína de la muestra biológica antes de cuantificar la proteína fucosilada.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha proteína se separa del fluido biológico con lectinas, anticuerpos, aptámeros o polipéptidos mediante dominios de reconocimiento de carbohidratos.
- 55 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las lectinas, anticuerpos, aptámeros o polipéptidos por dominios de reconocimiento de carbohidratos se acoplan respectivamente a un resto detectable.

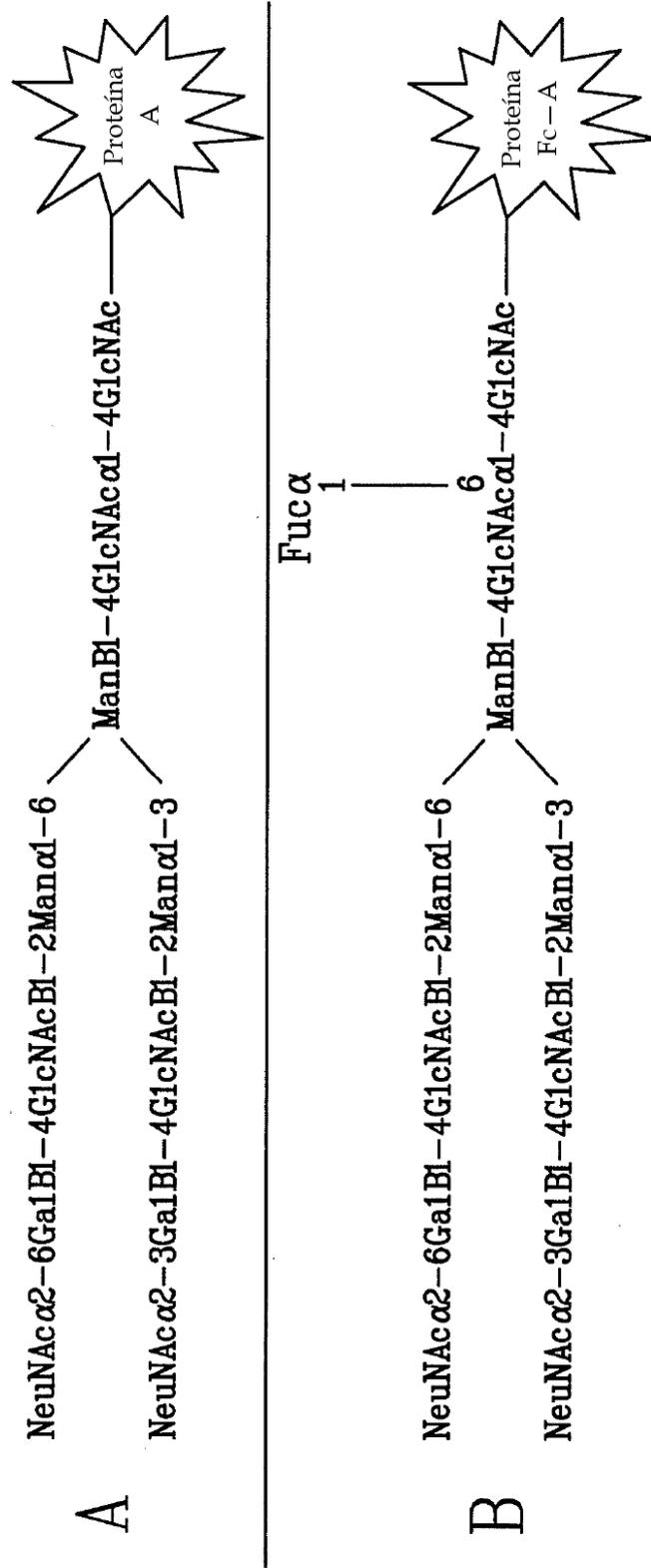


FIG. 1

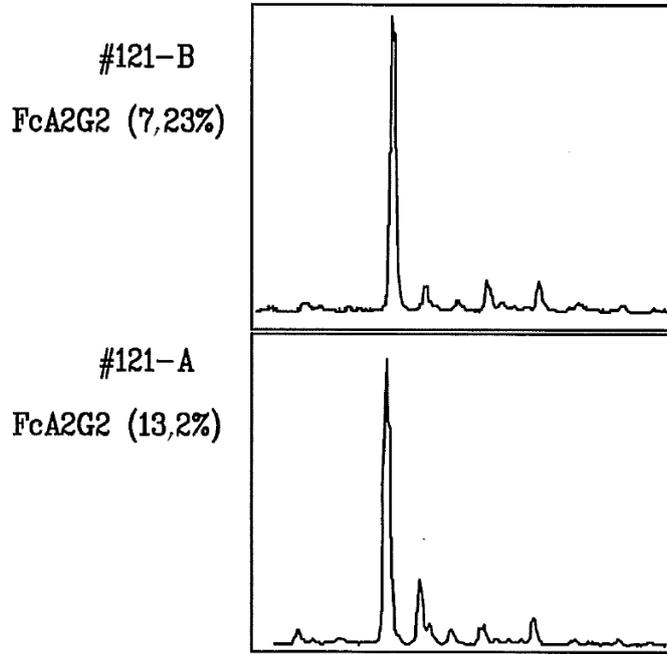


FIG. 2A

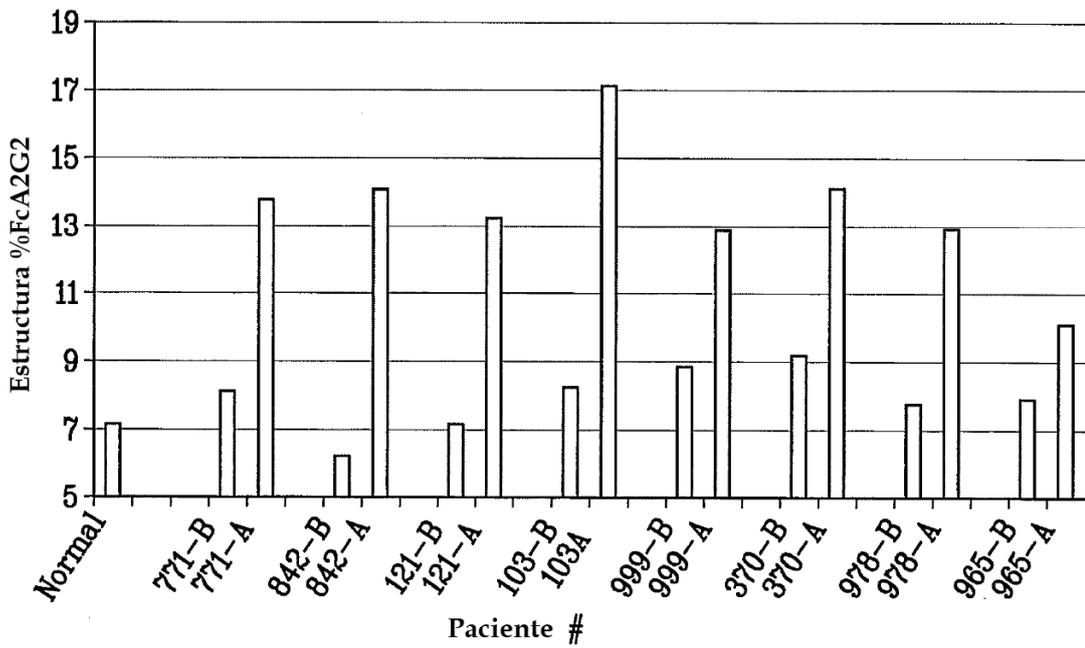


FIG. 2B

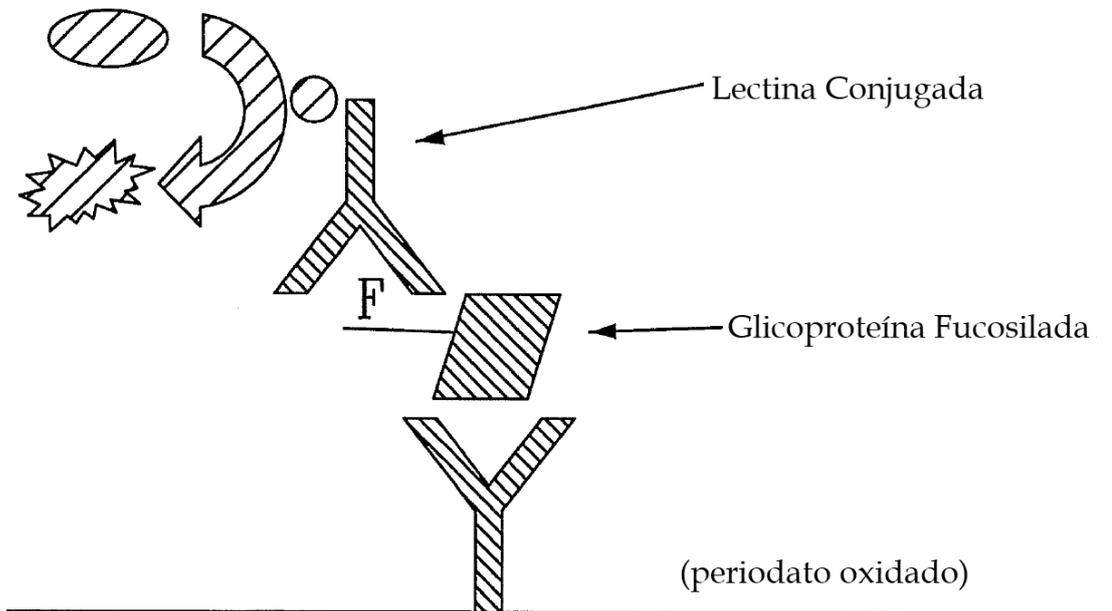


FIG. 3

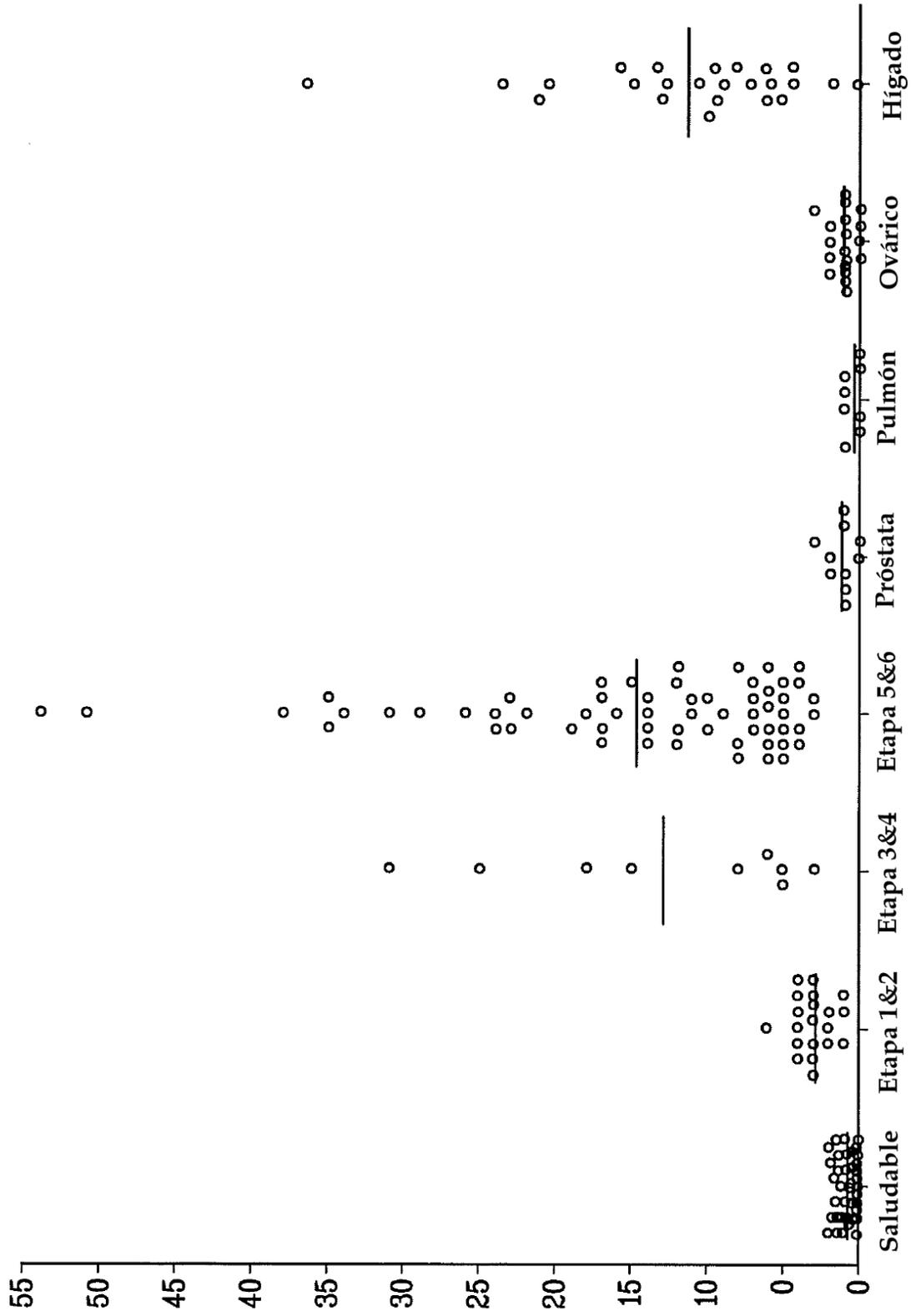


FIG. 4