



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 780**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04025621 .6**

86 Fecha de presentación : **28.10.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1626280**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Método para el diagnóstico de la fibrosis hepática.**

30 Prioridad: **12.08.2004 EP 04019134**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH
Universite d'Angers

72 Inventor/es: **Wienhues-Thelen, Ursula;**
Huedig, Hendrik y
Calès, Paul

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 282 780 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico de la fibrosis hepática.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la hepatología y de la fibrosis hepática. En particular hace referencia a un grupo de marcadores serológicos que se pueden utilizar para diagnosticar la fibrosis hepática, utilizados especialmente para diagnosticar la fibrosis hepática debida a la infección crónica por hepatitis C. Estos marcadores se pueden usar para controlar el tratamiento terapéutico de la fibrosis hepática.

Fundamento de la invención

15 La hepatopatía fibrótica se encuentra clasificada como la octava causa más frecuente de mortalidad, a la que se atribuyen 1,3 millones de muertes al año (Murray y Lopez, 1997, Lancet 349, 1269-1276). Los mecanismos celulares de la fibrosis son complejos. Como respuesta a la lesión hepática, por ejemplo, causada por la infección crónica del virus de la hepatitis C (VHC), la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), la esteatosis hepática o hepatopatía alcohólica, la hepatopatía farmacológica o medicamentosa o la cirrosis biliar idiopática, células estrelladas hepáticas normalmente quiescentes son activadas dando lugar a miofibroblastos. Estas células producen unas proteínas de matriz extracelular y liberan inhibidores titulares de las metaloproteinasas que se enlazan e inactivan las metaloproteinasas responsables de la degradación cicatricial. Como resultado de todo ello, la fibrosis y la cicatriz se pueden acumular a través de una producción elevada de tejido y de proteínas como el colágeno y una degradación reducida de estos compuestos, de manera que la función del hígado se ve alterada (McHutchinson 2004, CME Newsletter Tx Reporter Gastroenterology, 2-4).

Mientras que la fibrosis hepática es un proceso reversible que da lugar a la acumulación de matriz extracelular, la cirrosis hepática es un proceso irreversible que se caracteriza por unas bandas gruesas de matriz que rodean por completo el parénquima para formar nódulos. Si no se trata, la fibrosis hepática puede llevar a una cirrosis, posiblemente cáncer. Por esta razón, un diagnóstico a tiempo y preciso de la fibrosis hepática es esencial para lograr un tratamiento médico efectivo.

La biopsia hepática habitual todavía se considera como el tratamiento de referencia para la evaluación de la fibrosis y de la inflamación. La biopsia hepática se recomienda para clasificar y estadificar la enfermedad, confirmar el diagnóstico y establecer un valor de referencia para documentar la mejoría o la progresión de la enfermedad, ayudar a determinar el pronóstico y es necesaria para la terapia (McHutchinson, ver antes; para revisión ver Gebo y cols. 2002 Hepatology 36, 161-172).

Existen numerosos sistemas de clasificación histológica que se han utilizado para semicuantificar el grado de fibrosis hepática y de inflamación en pacientes con hepatitis C crónica. Uno de los sistemas de clasificación que más se utiliza es el sistema METAVIR (Bedossa y cols., 1994, Hepatology, 20, 15-20). METAVIR clasifica la fibrosis hepática en 5 fases o estadios que oscilan desde el F0 al F4. El F0 equivale a fibrosis nula, F1 corresponde a fibrosis leve (fibrosis portal sin tabiques). La fibrosis moderada a seria se clasifica como F2 a F4 (F2: poco tabique, F3: numerosos tabiques sin cirrosis), estadio F4 corresponde al último estadio de la cirrosis. La fibrosis se considera clínicamente significativa a partir de $F \geq 2$.

Pero existen algunos inconvenientes en la aplicación de la biopsia hepática para diagnosticar y estadificar la fibrosis. La fibrosis hepática está sujeta a un error de muestreo de manera que la parte pequeña de la muestra podría no reflejar la situación real en todo el hígado. Debido a ello no es un marcador preciso del proceso dinámico de degradación constante. Además los patólogos a menudo no están de acuerdo en sus lecturas de muestras histológicas donde se produce una variabilidad entre observadores y del propio observador en un 10 hasta un 20% de las biopsias (Cadranel y cols., 2000, Hepatology 32, 477-481).

La biopsia hepática es un procedimiento doloroso y traumático para el paciente. También está asociado a un riesgo de hemorragia y otras complicaciones después del muestreo. Además se trata de un procedimiento caro debido a las complicaciones previstas que siguen a la hospitalización del paciente.

La fibrosis hepática es la complicación principal de la infección crónica por VHC que lleva al desarrollo de una cirrosis y de una enfermedad hepática descompensada. Por lo tanto para el tratamiento eficaz de estos pacientes es esencial realizar una investigación dirigida que examine el desarrollo y la progresión de la fibrosis. La evaluación de la fibrosis progresiva se efectuará de la mejor manera con ensayos no traumáticos capaces de discriminar las fases intermedias de la fibrosis. Se han publicado una serie de marcadores individuales y de algoritmos de un grupo de marcadores, pero en la actualidad no se dispone de un biomarcador individual potente o de unas referencias de biomarcadores que permitan una predicción fiable de una fibrosis (Exactitud del diagnóstico > 80%). En el 2002 se promovieron investigaciones adicionales en el desarrollo de medidas dinámicas no agresivas de la fibrosis hepática por parte de los National Institutes of Health Consensus Development Conference. En particular, los estudios acerca de las alternativas a la biopsia hepática deberían aportar detalles suficientes sobre los métodos de biopsia (tamaño medio de las piezas de biopsia; grupo o cuadro calificativo, bien caracterizado histológicamente) para convencer a los lectores de

la exactitud del patrón de referencia. La biopsia hepática depende considerablemente de los criterios de rendimiento optimizados y puede conducir a una clasificación errónea de las fases histológicas debidas a la variabilidad entre observadores y a unos tamaños de muestra demasiado pequeños (<10 mm).

5 Ha habido una búsqueda amplia de marcadores serológicos o bioquímicos que reflejen los procesos fibróticos en la enfermedad del hígado y que puedan servir como un sustituto de la biopsia hepática. En los últimos años se han investigado un par de marcadores bioquímicos y serológicos no traumáticos o mínimamente agresivos, que ayuden a diagnosticar las enfermedades hepáticas. En particular, se han utilizado combinaciones de marcadores para categorizar pacientes de acuerdo con su fase o grado de fibrosis.

10 La US 6.631.330 revela el uso de una combinación de al menos 4 marcadores bioquímicos seleccionados del grupo formado por la α -2-macroglobulina, aspartatoaminotransferasa, γ -glutamyltranspeptidasa, γ -globulina, bilirrubina total, albúmina, α ₁-globulina, α ₂-globulina, haptoglobina, β -globulina, apoA1, IL-10, TGF- β 1, apoA2 y ApoB. Los valores obtenidos de 4 de estos marcadores se combinan matemáticamente para determinar la presencia de la fibrosis hepática. Con este grupo de marcadores se pueden obtener una exactitud diagnóstica de un 80%.

15 La solicitud de patente internacional WO 2003/073822 describe un método para diagnosticar la presencia o gravedad de la fibrosis hepática en un paciente. Este método utiliza la combinación de al menos tres marcadores que son el α -2-macroglobulina, el ácido hialurónico y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1). Con este método se puede obtener una exactitud diagnóstica de un 80% (Mc Hutchinson, 2004, ver antes).

20 Existe la necesidad de desarrollar un método no traumático o mínimamente agresivo para conseguir una exactitud superior en el diagnóstico a la hora de determinar la fibrosis hepática y clasificar y discriminar entre las diferentes fases de fibrosis de un modo más fidedigno que el que se conoce en la actualidad, de manera que sea posible el control del avance de la fibrosis y su respuesta al tratamiento. Además dicho método debería ser adecuado para pruebas en serie en analizadores automáticos.

30 Descripción de la invención

El problema se resuelve mediante un método conforme a la presente invención. El método para la detección de la presencia y/o gravedad de una enfermedad hepática en un paciente comprende las etapas siguientes:

- 35 a) medición del TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasa I) en una muestra obtenida de un paciente
- b) medición de A2M (alfa-2-macroglobulina) en dicha muestra
- c) medición de PLT (número de plaquetas en sangre) en dicha muestra
- 40 d) medición de PI (índice de protrombina) en dicha muestra
- e) medición opcional o bien determinación de al menos un parámetro adicional seleccionado del grupo formado por urea y GGT (gama-glutamyltranspeptidasa) en dicha muestra
- 45 f) medición opcional de al menos un parámetro bioquímico o clínico adicional en dicha muestra
- g) diagnóstico de la presencia y/o gravedad de una enfermedad hepática basado en la presencia de los niveles medidos de TIMP-1, A2M, PLT, PI y de los parámetros medidos según las etapas e) y f).

50 La presente invención permite una diferenciación segura entre la fibrosis F0/F1 y las fases F2/F3/F4. Además se puede llevar a cabo un control terapéutico como un control del tratamiento médico de las enfermedades hepáticas siguiendo el método de la invención.

55 El método de la presente invención está altamente correlacionado con las fases Metavir bien caracterizadas de la fibrosis hepática. Una ventaja especial del método de la presente invención en comparación con los métodos convencionales es el uso de un grupo calificador para minimizar errores de mala clasificación de observación patológica y de los modelos estadísticos.

60 El método de la invención comprende un método no agresivo íntimamente correlacionado con la gravedad de la fibrosis tal como ésta viene determinada por varios métodos: biopsia del hígado y métodos adicionales como la determinación del área de fibrosis.

65 El método de la presente invención se basa en un grupo estadísticamente relevante de muestras de pacientes con una fibrosis hepática bien caracterizada que abarca todo el campo de fases Metavir y de muestras de individuos sin fibrosis hepática debida a hallazgos histológicos (puntuación Metavir:0). Los criterios de selección iniciales de las muestras es la puntuación Metavir. Esta referencia viene confirmada en una doble evaluación y de forma optimizada ya que utiliza muestras con tamaños superiores a 15 mm.

El método de la invención actual permite una predicción segura de la fibrosis con una exactitud en el diagnóstico (ED) de al menos un 85%, preferiblemente de al menos un 87%. Puesto que incluso el estándar de referencia no es un patrón o una referencia de la fibrosis hepática con respecto a la clasificación errónea opcional de fases de fibrosis y conduce además a dolor y a riesgos en la salud del paciente, el método de la presente invención representa una alternativa a la biopsia.

El método permite la investigación del desarrollo y del avance de la fibrosis permitiendo un tratamiento eficaz de los pacientes con VHC crónico. El control de la enfermedad de los pacientes con VHC crónico puede ser realizado en un breve intervalo de tiempo en comparación con la biopsia. El método permite controlar el éxito de la terapia antifibrótica.

El método permite también la investigación del desarrollo y del avance de la fibrosis en los individuos con una lesión hepática crónica. Este es un trastorno relativamente frecuente con unos síntomas mínimos, incluso con un riesgo a largo plazo de morbilidad y mortalidad significativas, que se define patológicamente por una necrosis hepática que avanza y una inflamación en el hígado, a menudo acompañada por una fibrosis. El VHC es la forma más frecuente de lesión hepática crónica. El método se puede aplicar a otras formas de lesión hepática crónica: esteatohepatitis alcohólica (EHA), enfermedad del hígado graso alcohólico (EHGA), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) o bien enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Los métodos de la invención se pueden utilizar para controlar la gravedad de la EHNA y la EHGNA. Se pueden utilizar para diagnosticar la fibrosis hepática en un individuo con hepatitis vírica como el virus de la hepatitis A, B, C o D o bien el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis crónica persistente o crónica activa, enfermedad hepática autoinmunitaria, como la hepatitis autoinmunitaria y la enfermedad hepática inducida por fármacos; la cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, atresia biliar, enfermedad del hígado resultante del tratamiento médico o de una enfermedad del hígado congénita. La invención puede ser utilizada para controlar el tratamiento con un fármaco con el riesgo de una enfermedad hepática.

De acuerdo con la presente invención las combinaciones preferidas de los parámetros son TIMP-1, A2M, PLT, PI también llamada SNIFF 4c, siendo SNIFF la abreviación francesa de store non-invasif de fibrose du foie; en inglés: nivel no agresivo de fibrosis hepática) con una exactitud del diagnóstico del 84%; TIMP-1, A2M, PLT, PI, urea (SNIFF 5a) con una exactitud del diagnóstico del 84%; y TIMP-1, A2M, PLT, PI, urea, GGT (SNIFF 6b) con una exactitud del diagnóstico del 87,4%. Estas combinaciones preferidas se pueden ver también en la tabla 3.

En el sentido de la presente invención, los términos específicos y las expresiones se deberían entender del modo siguiente:

Exactitud del diagnóstico (ED) es la exactitud de la prueba en sí. Esto significa el porcentaje de todas las pruebas que son realmente positivas o realmente negativas. Cuanto mayor es la exactitud del diagnóstico más seguros son los resultados de la prueba. La ED se calcula como la suma de los verdaderos positivos y de los verdaderos negativos dividida por el número total de resultados de las muestras y este valor viene influido por la prevalencia de fibrosis en la población analizada.

El valor de corte es la concentración aritmética calculada de un biomarcador individual o de una combinación de varios biomarcadores para la discriminación de un estado sano o enfermo. En lo que se refiere al valor de corte de la invención se trata de un valor de 0,5. Si este valor es superior o igual a 0,5 ($\geq 0,5$) esto significa que se alcanza la fase Metavir F2 para distinguir entre fibrosis leve o nula (fases Metavir F0 o F1) y la fibrosis clínicamente significativa FCS (fases Metavir F2, F3, F4).

El valor predictivo positivo (VPP) es el porcentaje de pruebas positivas que son verdaderos positivos.

El valor predictivo negativo (VPN) equivale al porcentaje de pruebas negativas que son verdaderos negativos.

La puntuación o el valor equivalen a una combinación aritmética de varios biomarcadores asociados a la fibrosis. En particular, el valor que aquí se utiliza tiene un intervalo entre 0 (fibrosis mínima) y 1 (FCS: fibrosis clínicamente significativa).

AUROC equivale al área bajo la curva de características del operador receptor. En estas curvas, la sensibilidad se representa gráficamente frente al recíproco de la especificidad. Un área bajo la curva ROC de 1.00 indicaría un ideal de la sensibilidad del 100% y una especificidad del 100%. Cuanto mayor la pendiente al comienzo de la curva mejor es la relación entre sensibilidad y especificidad de una prueba.

La sensibilidad es la probabilidad de un resultado positivo de la prueba en un paciente con una enfermedad o con un factor de riesgo o en otro estado de salud.

La especificidad es la probabilidad de un resultado de la prueba negativo en un paciente que no tiene la enfermedad.

TIMP-1 (inhibidor tisular de la metaloproteína I) es una sialoglucoproteína del aminoácido 184 con un peso molecular de 28,5 kDA (ver por ejemplo, Murphy y cols., Biochem J. 1981, 195, 167-170) que inhibe las metaloproteinasas como la colagenasa intersticial MMP-1 o la estromelina o gelatinasa B. En la comprensión de la presente

ES 2 282 780 T3

invención, el término TIMP-1 abarca una proteína con una homología estructural significativa respecto al TIMP-1 humano, que inhibe la actividad proteolítica de las metaloproteinasas. La presencia de TIMP-1 humano se puede detectar usando anticuerpos que detecten específicamente epítomos de TIMP-1. El TIMP-1 puede determinarse también por detección de ácidos nucleicos afines como el mRNA correspondiente.

5

La A2M (α -2-macroglobulina) es una proteína conservada, altamente abundante en plasma que sirve como una proteína de enlace de la proteasa para purificar las proteasas activas de los fluidos tisulares. La A2M no inactiva la actividad catalítica de una proteasa pero actúa mediante la compresión física de la proteasa de referencia doblándose alrededor de la proteasa. Una proteasa comprimida por la A2M se encuentra impedida estéricamente para escindirse en proteínas sustrato. En el sentido de la invención, la A2M puede ser detectada mediante una valoración inmunológica utilizando anticuerpos específicos según los formatos de prueba conocidos por un experto en la materia. La A2M puede ser determinada también mediante la detección de ácidos nucleicos afines como el mRNA correspondiente.

10

El PLT (número de plaquetas en sangre) es el número de plaquetas en sangre y se determina mediante el recuento de plaquetas usando un contador disponible en el comercio.

15

El PI (índice de protrombina) es útil para detectar las interferencias en el sistema de coagulación y se puede determinar añadiendo tromboplastina a la muestra de plasma y midiendo el tiempo de coagulación en segundos (llamado Quick-time). Este valor se correlaciona con un cociente normalizado internacional que contiene un factor de corrección que tiene en cuenta la sensibilidad de la tromboplastina usada.

20

De acuerdo con la invención, se pueden determinar parámetros bioquímicos o clínicos adicionales. El parámetro bioquímico adicional puede ser cualquier parámetro asociado directa o indirectamente con el metabolismo o la estructura del hígado como, por ejemplo, la ferritina, hialuronato, AST (aspartato-aminotransferasa), MMP-2 (matriz metaloproteinasas-2), ALT (alanina-aminotransferasa), PIIINP (propéptido N-terminal del procolágeno tipo III), bilirrubina, haptoglobina, ApoA1. Se pueden determinar también la hepcidina o la adiponectina.

25

La hepcidina es una proteína hepática, identificada originalmente como un péptido antimicrobiano circulante. Se trata del jugador central en la comunicación de los almacenes de hierro del cuerpo con respecto a las células de absorción intestinal. La adiponectina es secretada por los adipocitos y circula en unas concentraciones sistémicas relativamente elevadas para influir en la función metabólica. Los niveles reducidos de adiponectina sérica indican un riesgo elevado de enfermedades, por ejemplo, gravedad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

30

Se pueden determinar parámetros clínicos adicionales como la edad, el sexo, el peso, los hábitos nutricionales del paciente.

35

La urea, GGT (gama-glutamilttransferasa), ferritina, hialuronato, AST (aspartato-aminotransferasa) y ALT (alanina-aminotransferasa), ferritina, MMP-2, PIIINP bilirrubina, heptoglobina, ApoA1, hepcidina y adiponectina son determinadas mediante estuches de prueba disponibles en el comercio por medio de métodos inmunológicos o fotométricos conocidos por el experto en el tema. En caso de que sea posible se usarán técnicas de hibridación para la detección de ácidos nucleicos que sean específicos para un análisis o parámetro (como el mRNA correspondiente) para la determinación de un parámetro.

40

La invención utiliza la determinación de una pluralidad de parámetros. Por lo tanto la detección de esos parámetros bioquímicos y serológicos de la invención que puede ser llevada a cabo en formatos de prueba usando una fase sólida se lleva a cabo preferiblemente en sistemas de prueba miniaturizados a base de matrices tal como se describe en US 2003/0017616 o bien WO 99/67643. Estos sistemas de prueba tiene múltiples áreas de prueba definidas en el espacio y cada una de ellas se puede utilizar para detectar un análisis o parámetro específico único. Por consiguiente, en un única serie analítica se pueden detectar una pluralidad de análisis.

45

50

El término "áreas o zonas de prueba definidas" sobre una fase sólida equivale a decir que las áreas de prueba comprenden unas regiones definidas de la fase sólida que se encuentran preferiblemente separadas en el espacio de otras áreas de prueba por unas regiones inertes. Las áreas de prueba definidas tienen preferiblemente un diámetro de 10 μ m a 1 cm y en particular de 10 μ m a 5 mm. Las áreas de prueba miniaturizadas con un diámetro de 10 μ m a 2 mm son las más preferidas. Se prefieren las fases sólidas con varias áreas de prueba a las que se conoce también por sistemas matriciales. Dichos sistemas matriciales se han descrito, por ejemplo, en Ekins y Chu (Clin. Chem. 37, 1995, 1955-1967) y en las patentes americanas números 5.432.099, 5.516.635 y 5.126.276. Tal como se ha mencionado antes, una ventaja de los sistemas matriciales es que se pueden realizar varias determinaciones de análisis y de control simultáneamente en una muestra. El uso de áreas de control para detectar el enlace no específico y/o muestras que interfieren puede mejorar considerablemente la veracidad de los resultados especialmente con sistemas matriciales miniaturizados.

55

60

En la invención actual, la detección de TIMP-1 y A2M y posiblemente de otros parámetros bioquímicos idóneos para los métodos de detección que aplican una fase sólida podría realizarse, por ejemplo, simultáneamente usando dicho sistema matricial.

65

ES 2 282 780 T3

De acuerdo con la invención, la fase sólida es cualquier soporte convencional para los métodos de detección, preferiblemente un soporte no poroso, por ejemplo, un soporte con una superficie de plástico, vidrio, metal o bien óxido metálico. Los soportes porosos como las tiras de ensayo son también adecuados. Las regiones separadas en el espacio (zonas de prueba) están situadas sobre este soporte. Los receptores de fase sólida inmovilizados se aplican a estas zonas de prueba. Los receptores de fase sólida son inmovilizados por los métodos conocidos, por ejemplo, por un enlace de adsorción directo, por un enlace covalente o por un acoplamiento a través de pares de enlace de elevada afinidad, por ejemplo, estreptavidina (o avidina)/biotina, antígeno/anticuerpo o azúcar/lectina. La presencia o/y la cantidad de análito en una muestra puede ser determinada por el enlace específico de componentes del medio de detección, por ejemplo, del análito que se va a determinar o de un análito análogo al receptor de la fase sólida.

La detección de parámetros sujetos a ensayos de fase sólida puede ser realizada naturalmente en sistemas convencionales, no miniaturizados como los pocillos, tubos o microsferas.

La detección del análito y en caso de necesidad la detección de la presencia de reacciones de interferencia se consigue en el método conforme a la invención de forma conocida usando los grupos de marcadores adecuados, por ejemplo, los grupos de marcadores fluorescentes. Alternativamente a las fases sólidas adecuadas es posible detectar también la interacción de componentes del medio de detección con las áreas de prueba y de control opcionales determinando el grosor de capa de cada una de las áreas, por ejemplo, mediante una espectroscopia de resonancia de plasmón.

Con sistemas matriciales en los cuales se detectan varios análisis de una muestra al mismo tiempo, es preferible utilizar un grupo de marcadores universal que permita una detección simultánea de varios análisis diferentes respecto a diferentes áreas de prueba. Un ejemplo de dichos grupos de marcadores universales son los grupos de marcadores que llevar un receptor que puede interactuar de forma específica con un receptor complementario en un reactivo de prueba, por ejemplo, un receptor soluble para un análisis que va a ser determinado o bien para un análisis análogo (como anticuerpo/antígeno o estreptavidina/biotina etc.).

El término muestra equivale a una muestra biológica que contiene o bien presumiblemente contiene al menos uno de los marcadores conforme a la invención. Por ejemplo, se puede utilizar como muestra sangre, suero, plasma, orina, saliva, líquido sinovial o tejido hepático. Las muestras líquidas pueden diluirse antes del análisis si es preciso.

Para obtener un resultado que ayude a diagnosticar la enfermedad se utilizan algoritmos matemáticos conocidos por el experto. Los datos obtenidos se combinarán y evaluarán mediante métodos estadísticos como la regresión binaria logística, dando lugar a unas puntuaciones.

La figura 1 muestra datos brutos como los medidos en 120 pacientes que padecen de una infección por hepatitis C.

La figura 2 muestra la distribución de una de las puntuaciones preferidas (SNIFF 6b) y una combinación actual por Fibrotest en función del grado de Metavir F. Puede observarse que el método de la presente invención tiene menos pacientes mal clasificados en las fases Metavir F3 y F4 en comparación con el método Fibrotest. En particular, la SNIFF 6b clasifica erróneamente sólo una muestra de fase F3 como negativa (por debajo de la puntuación 0,5) mientras que el Fibrotest clasifica erróneamente varias muestras.

Con más detalle la puntuación del Fibrotest combina A2M, haptoglobina, ApoA1, bilirrubina, GGT, edad y sexo de un paciente. Estos siete parámetros de Fibrotest alcanzan una exactitud de diagnóstico de aproximadamente un 80% mientras que la puntuación del SNIFF 6b alcanza una exactitud superior al 87% (ver también la tabla 3).

La figura 3 muestra unas curvas ROC para grupos de fibrosis significativos desde un punto de vista clínico de acuerdo con el método de la invención (SNIFF 6b) en comparación con el método de US 6.631.330 (Fibrotest 7). La curva ROC para la invención da lugar a una mayor pendiente y un valor AUROC superior al del método actual: AUROC $0,920 \pm 0,036$ (SNIFF 6b) frente a $0,857 \pm 0,026$ (Fibrotest 7).

La invención se ilustra además en el ejemplo siguiente:

Ejemplo

Se utilizaban estuches de prueba disponibles en el comercio y todas las pruebas se realizaban de acuerdo con las instrucciones dadas por los fabricantes que se indican a continuación.

TABLA 1

Biomarcador	Método	Proveedor
AST, ALT	Análisis bioquímico clínico de la sangre	Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Alemania
GGT	Análisis bioquímico clínico de la sangre	Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Alemania
Bilirrubina	Análisis bioquímico clínico de la sangre	Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Alemania
Urea	Análisis bioquímico clínico de la sangre	Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Alemania
A2M	Nefelometría	Dade Behring Marburg GmbH
Apo A1	Nefelometría	Dade Behring Marburg GmbH
Plaquetas	Recuento plaquetario	Bayer Diagnostics
PI	Tiempo de coagulación	Diagnostica Stago
Hialuronato	Elisa	Corgenix Inc.
PIIINP	RIA	Cis Bio International
YKL-40	Elisa	Quidel Corporation
TIMP1	Elisa	Amersham Pharmacia
MMP2	Elisa	Amersham Pharmacia

La figura 1 muestra los datos brutos tal como se han medido en muestras de 120 pacientes que padecen de una infección por hepatitis C. Para obtener los datos se utilizaban los estuches de prueba indicados.

En la tabla 2, se mencionan la exactitud diagnóstica y los valores AUROC. Puede verse que cada marcador individual tiene una exactitud inferior al 80%.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 282 780 T3

TABLA 2

Biomarcador	Exactitud de diagnóstico		Correlación		AUROC	
	%	p	r	P	c	p
A2M	76,7	<10 ⁻⁴	0,523	<10 ⁻⁴	0,800	<10 ⁻⁴
TIMP 1	72,3	<10 ⁻⁴	0,663	<10 ⁻⁴	0,813	<10 ⁻⁴
Ferritina	71,7	<10 ⁻⁴	0,433	<10 ⁻⁴	0,771	<10 ⁻⁴
HA	71,7	0,002	0,561	<10 ⁻⁴	0,762	<10 ⁻⁴
Plaquetas	70,8	<10 ⁻⁴	-0,523	<10 ⁻⁴	0,259	<10 ⁻⁴
AST	69,2	<10 ⁻⁴	0,444	<10 ⁻⁴	0,782	<10 ⁻⁴
Índice de Protrombina	69,2	<10 ⁻⁴	-0,444	<10 ⁻⁴	0,265	<10 ⁻⁴
GGT	67,5	0,002	0,229	0,012	0,721	<10 ⁻⁴
MMP 2	67,2	<10 ⁻⁴	0,451	<10 ⁻⁴	0,711	<10 ⁻⁴
ALT	66,7	0,002	0,311	0,001	0,696	<10 ⁻⁴
YKL 40	65,3	0,001	0,480	<10 ⁻⁴	0,661	0,002
Edad	62,5	0,001	0,345	<10 ⁻⁴	0,706	<10 ⁻⁴
P3P	62,5	0,02	0,337	<10 ⁻⁴	0,626	0,019
Bilirrubina	61,7	0,02	0,107	0,247	0,628	0,017
Haptoglobina	61,7	0,01	-0,285	0,002	0,356	0,007
ApoA1	60,0	0,03	-0,229	0,012	0,361	0,009
Sexo	53,3	0,37	-	-	-	-
Urea	51,7	0,28	-0,058	0,527	0,470	0,572

La tabla 3 muestra una comparación de ED/AUROC con los métodos actuales. Se observaba que los métodos de la presente invención tenían una exactitud de diagnóstico (ED) superior de la fibrosis significativa desde un punto de vista clínico por regresión logística binaria en comparación con los métodos de US 6.631.330 y WO2003/073822.

ES 2 282 780 T3

TABLA 3

Método	VARIABLES SELECCIONADAS	n var	n Pts	R ²	ED	AUROC
	PLT, PI, TIMP-1, A2M, Urea, GGT	6	119	0,651	87,4	0,920
	PLT, PI, TIMP-1, A2M, Urea	5	119	0,624	84,0	0,910
	PLT, PI, TIMP-1, A2M	4	119	0,584	84,0	0,907
WO 2003/073822	A2M, TIMP-1, HA	3	118		80,7	0,898
US 6,631,330 (Fibrotest)	A2M, edad, Hapto, Apo, Bili, GGT, sexo	7	120	0,518	80,8	0,857
US 6,631,330	A2M, edad, Apo, GGT	4	120	0,487	77,5	0,859

n var es el número de variables analizadas de los parámetros, nPts equivale al número de pacientes analizados.

ES 2 282 780 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la presencia y/o gravedad de una hepatopatía en un paciente que comprende

- a) medición del TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasa I) en una muestra obtenida de un paciente
- b) medición de A2M (alfa-2-macroglobulina) en dicha muestra
- c) medición de PLT (número de plaquetas en sangre) en dicha muestra
- d) medición de PI (índice de protrombina) en dicha muestra
- e) medición opcional o bien determinación de al menos un parámetro adicional seleccionado del grupo formado por urea y GGT (gama-glutamyltranspeptidasa) en dicha muestra
- f) medición opcional de al menos un parámetro bioquímico o clínico adicional en dicha muestra
- g) diagnóstico de la presencia y/o gravedad de una enfermedad hepática basado en la presencia de los niveles medidos de TIMP-1, A2M, PLT, PI y de los parámetros medidos según las etapas e) y f).

2. Método conforme a la reivindicación 1 utilizado par controlar el tratamiento terapéutico de la fibrosis hepática

3. Método conforme a la reivindicación 1 para clasificar la fibrosis hepática.

FIGURA 1/3

Página 1

Sample No.	Bleed Sample (mm)	Metav. Stage	Age (years)	Sex	Platlets (10 ⁹ /L)	Pi (%)	Urea (mmol/L)	Bilirubin (µmol/L)	GGT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Albumin (g/L)	Glob (g/L)	Ferritin (ng/ml)	Apoa1 (g/L)	Hyduronate (µg/L)	A2M (mg/dl)	PIIIP (U/ml)	Haptoglobin (mg/ml)	YKL-40 (ng/ml)	TIMP1 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CSF
1	25	3	63	1	123	80	7,8	11	83	66	114	41	18	827	1,30	273	374	1,20	0,41	284	43	888	1
2	14	0	40	1	171	86	4,5	11	11	68	157	40	10	12	1,75	65	334	0,83	0,63	2501	2,801	1,377	0
3	9	0	50	1	288	89	6,8	22	27	27	59	44	9	356	1,37	25	157	1,32	1,67	812	1,252	2,265	0
4	24	4	45	2	81	71	4,1	11	90	118	121	35		350	1,09	497	314	1,68	0,43	316	1,556	2,265	0
5	8	1	51	2	217	90	6,4	6	43	28	81	44	8	64	2,53	32	180	0,74	2,47	115	1,556	2,265	0
6	23	1	35	2	168	112	15,4	5	104	104	209	37	16	141	1,78	111	239	2,32	0,36	351	2,011	1,688	0
7	30	1	36	1	178	97	3,2	12	17	43	78	57	15	151	1,60	22	273	0,62	1,89	193	1,474	1,128	0
8	28	3	46	1	147	60	4,3	16	148	113	120	37	18	739	1,41	69	441	0,81	1,89	312	1,474	1,128	0
9	11	0	58	2	238	100	7,2	8	37	34	51	44	13	55	1,88	25	177	0,92	1,28	183	1,089	1,412	0
10	10	0	37	1	231	86	5,0	11	68	41	78	49	12	424	1,48	29	148	0,76	1,68	60	827	1,373	0
11	17	3	55	2	132	60	3,9	16	23	24	42	47	18	289	1,10	44	332	0,50	1,04	312	1,367	1,345	0
12	22	0	31	2	250	90	4,0	3	21	19	13	43	10	44	1,32	25	236	0,84	1,28	60	827	1,373	0
13	16	1	32	1	276	99	3,6	10	32	45	68	45	16	162	1,63	25	158	0,74	0,91	62	774	1,483	0
14	15	2	69	2	236	95	8,1	7	90	65	68	44	12	208	1,97	28	389	0,73	1,07	64	975	1,448	1
15	21	2	69	2	236	95	8,1	7	90	65	68	44	12	208	1,97	28	389	0,73	1,07	64	975	1,448	1
16	19	4	82	1	91	74	5,4	12	28	63	133	44	20	179	2,08	221	280	1,19	1,97	279	1,809	2,053	1
17	28	1	34	1	246	84	5,6	11	18	48	89	49	14	174	1,12	128	332	1,12	1,02	158	1,809	2,053	1
18	17	1	68	1	188	88	11,4	15	118	18	35	42	12	174	1,25	29	221	0,70	1,02	70	973	1,430	0
19	20	1	31	2	284	120	4,8	8	83	23	61	48	10	160	1,49	25	221	0,55	1,52	68	1,009	1,098	0
20	20	1	68	1	138	87	12,4	13	27	30	67	50	11	120	1,40	40	655	0,40	0,30	134	1,070	1,219	0
21	18	1	36	2	350	101	6,8	3	23	17	40	41	14	33	1,27	25	189	1,03	0,94	108	1,308	978	0
22	18	0	38	1	697	88	4,0	2	37	58	78	43	17	15	1,30	52	233	0,70	2,31	90	1,340	1,745	0
23	18	1	33	1	635	80	8,1	4	35	38	87	41	16	6	1,10	74	340	0,40	1,69	208	925	1,273	0
24	20	1	41	5	27	33	58	41	8	98	1,30	25	204	1,70	1,12	29	221	0,54	1,70	110	907	1,242	0
25	26	2	53	1	163	96	8,6	6	17	40	52	41	8	98	1,30	25	221	0,54	1,70	110	907	1,242	0
26	20	1	68	1	200	88	6,5	6	17	40	52	41	8	98	1,30	25	221	0,54	1,70	110	907	1,242	0
27	23	1	45	1	179	103	3,9	7	38	67	120	41	11	118	0,80	25	245	0,71	1,18	61	1,110	1,991	1
28	16	4	44	1	117	68	4,4	8	151	89	108	48	13	352	1,09	287	314	1,35	0,81	361	1,652	1,631	0
29	18	2	27	1	287	85	4,0	49	65	46	130	48	8	313	0,83	20	189	0,74	1,18	87	1,652	1,631	0
30	16	3	29	1	146	88	7,3	6	40	25	37	49	13	107	1,71	144	289	0,87	1,18	87	1,652	1,631	0
31	18	1	46	1	135	80	5,8	13	173	183	242	62	6	184	1,12	292	954	1,30	0,60	159	1,469	1,796	1
32	15	1	23	1	211	100	3,8	10	20	20	97	45	13	107	1,40	20	247	0,70	1,26	28	884	1,256	0
33	20	2	37	1	260	101	4,5	5	119	21	49	42	10	267	1,31	15	178	0,65	2,71	58	833	988	1
34	13	0	28	1	238	103	6,4	11	87	30	90	48	8	134	1,24	14	119	0,58	0,60	48	773	1,371	0
35	21	1	29	2	263	108	3,7	6	59	38	44	45	8	58	1,80	25	169	0,60	1,98	40	1,173	891	0
36	24	1	29	1	222	98	2,1	17	388	135	234	48	15	158	1,60	20	169	0,60	1,35	108	902	1,407	0
37	17	4	61	2	102	70	3,1	10	392	147	111	35	40	751	1,30	216	287	1,84	1,21	351	1,928	2,695	1
38	19	4	64	2	189	96	5,9	17	41	48	68	47	11	98	1,21	38	231	1,13	1,11	85	1,293	1,265	1
39	19	4	64	2	85	118	11,8	15	134	100	152	44	10	88	1,70	354	321	1,13	1,11	309	2,501	1,556	1
40	16	4	56	1	104	78	4,8	14	215	28	42	39	32	628	1,60	122	235	1,20	0,70	300	1,879	2,209	1
41	16	2	40	1	216	97	3,7	8	647	150	354	48	17	1,114	1,19	47	359	0,75	1,60	50	1,495	1,398	1
42	20	0	30	1	150	83	6,3	10	78	58	140	64		365	1,60	12	254	0,74	1,68	69	1,024	1,188	0
43	20	0	43	1	242	100	4,0	14	87	40	47	46	8	489	1,37	25	320	0,67	0,88	64	1,316	1,485	1
44	15	3	48	1	181	93	2,9	10	303	28	60	46	10	80	1,77	25	185	0,81	1,07	105	1,170	1,238	0
45	19	3	48	1	326	83	3,5	4	27	13	14	61	10	392	1,66	26	185	0,81	1,07	105	1,170	1,238	0
46	22	0	32	1	234	86	5,4	11	100	90	203	48	15	392	1,66	26	185	0,81	1,07	105	1,170	1,238	0
47	22	0	37	1	222	87	4,1	12	20	22	56	63	13	113	1,10	9	275	0,81	0,80	97	1,483	1,434	0
48	24	1	34	1	218	103	3,7	9	105	67	113	48	6	485	1,99	28	277	0,37	1,05	41	968	699	0
49	13	0	34	1	227	93	6,2	8	153	158	392	47	13	364	0,83	33	465	1,34	0,80	78	983	1,078	0
50	22	4	40	1	176	86	3,8	6	35	124	228	45	13	118	1,25	25	222	0,70	1,13	88	985	1,043	0
51	24	2	38	1	162	78	5,4	10	17	43	64	44	9	118	1,25	34	319	0,89	0,52	318	1,489	1,301	0
52	24	2	38	1	162	78	5,4	10	17	43	64	44	9	118	1,25	34	319	0,89	0,52	318	1,489	1,301	0
53	20	1	32	1	243	97	5,0	11	11	14	33	41	10	207	1,60	30	212	0,89	1,39	71	827	1,187	0
54	15	2	50	2	202	98	4,4	16	20	27	66	48	12	80	1,89	68	394	0,84	1,22	40	1,234	1,483	1
55	17	1	32	1	202	100	5,8	12	87	16	64	51	7	289	1,70	30	252	0,84	1,35	62	583	884	0
56	22	4	72	1	154	85	4,7	17	190	158	159	44	12	102	1,60	158	325	0,52	0,72	320	2,138	1,780	1

FIGURA 1/3

Página 2

57	1	165	82	5,5	17	140	148	131	44	10	814	1,08	60	359	0,82	0,70	33	1,525	1,025	1
58	2	315	95	7,5	13	46	19	80	39	10	72	1,90	45	167	0,66	1,49	48	726	691	0
59	1	156	66	3,7	9	305	234	277	42	17	764	0,95	278	459	1,84	1,42	351	2.501	1.570	1
60	2	271	105	6,8	12	28	33	70	48	24	29	1,60	12	219	0,90	1,40	72	781	1.410	0
61	3	197	100	7,8	6	132	43	56	44	9	402	1,87	24	390	1,28	1,71	111	1.551	1.497	1
62	2	270	91	3,8	7	6	28	44	48	16	29	1,36	27	160	0,73	0,80	76	1.272	1.454	0
63	1	248	95	5,1	7	12	18	25	46	16	107	1,29	12	229	0,88	1,09	40	775	1.281	0
64	2	234	82	3,7	6	33	71	101	47	15	138	1,51	35	361	1,09	1,71	32	815	1.935	1
65	3	213	80	1,7	6	78	67	105	47	15	188	1,06	70	447	1,28	0,44	172	1.776	1.419	1
66	1	208	85	7,0	11	19	26	37	45	10	121	1,53	25	145	0,75	1,52	41	1.201	946	0
67	2	172	90	3,4	11	60	85	165	48	18	489	0,98	59	478	2,04	1,72	63	1.165	1.698	1
68	1	175	104	6,7	9	39	38	74	48	10	267	1,34	37	179	0,82	1,27	27	933	1.231	0
69	2	233	89	3,6	19	44	40	66	44	19	82	1,54	25	353	0,71	0,86	70	869	1.157	0
70	1	240	84	9,3	25	17	16	24	56	17	32	1,54	17	295	0,71	0,86	48	1.248	1.477	0
71	1	217	104	4,6	12	28	46	79	46	16	242	2,68	228	212	1,03	0,74	321	1.402	979	0
72	2	190	93	5,4	6	40	72	112	48	15	158	1,50	33	286	1,32	0,47	172	1.413	2.072	1
73	3	163	113	6,2	9	342	123	189	48	12	1.218	1,83	62	469	0,74	1,26	249	975	1.288	1
74	1	202	82	5,0	14	52	93	206	52	13	362	1,28	49	266	1,64	0,60	46	861	1.411	0
75	0	230	109	4,0	17	33	54	119	48	12	192	1,43	25	152	0,75	0,44	89	904	1.288	0
76	4	159	82	6,7	13	189	64	87	41	13	601	1,42	83	204	0,80	0,50	271	1.169	1.601	0
77	1	137	86	4,7	10	22	46	78	45	12	57	1,44	14	148	0,88	0,51	30	1.158	1.601	0
78	3	174	100	2,3	8	212	132	135	47	17	398	2,60	18	313	0,50	0,43	235	895	1.078	1
79	1	204	105	5,8	8	36	30	38	66	12	244	1,79	25	300	0,85	0,36	134	1.465	1.913	0
80	1	328	86	5,3	8	21	30	38	66	13	107	1,26	25	307	0,83	2,19	73	1.292	942	0
81	1	177	82	6,6	12	57	192	544	45	18	235	1,87	27	279	0,68	1,83	155	1.151	1.238	0
82	2	160	82	5,2	10	42	48	52	42	10	84	1,24	104	480	0,72	0,30	11	1.197	1.349	1
83	2	349	105	4,4	14	53	167	246	46	17	133	1,67	17	116	0,78	0,30	11	1.197	1.349	1
84	2	143	102	4,9	14	53	167	246	46	17	133	1,67	17	116	0,78	0,30	11	1.197	1.349	1
85	2	178	92	2,9	27	412	59	78	45	11	515	0,80	21	420	0,50	0,60	213	1.352	1.713	1
86	1	178	92	2,9	27	412	59	78	45	11	515	0,80	21	420	0,50	0,60	213	1.352	1.713	1
87	2	298	104	4,8	4	219	40	66	43	12	721	1,65	25	248	0,59	1,41	305	660	1.322	0
88	1	178	85	5,1	12	55	42	71	41	7	380	1,44	54	174	0,73	0,91	307	1.247	1.267	0
89	2	263	91	5,0	6	21	16	36	40	11	42	1,60	32	173	0,80	0,79	39	1.077	1.780	1
90	2	342	100	6,0	8	32	24	20	48	12	10	1,98	25	213	0,69	1,15	89	1.117	1.325	0
91	2	243	88	6,0	6	20	55	139	41	10	164	1,43	25	145	0,66	0,63	89	1.117	1.325	0
92	1	137	93	6,1	13	125	118	268	50	13	1.306	1,32	45	358	1,07	0,30	159	1.252	1.508	1
93	2	143	92	5,6	18	34	55	108	54	19	349	1,02	45	255	1,30	0,32	118	1.111	1.024	1
94	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
95	1	188	85	8,9	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
96	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
97	1	188	85	8,9	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
98	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
99	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
100	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
101	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
102	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
103	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
104	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
105	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
106	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
107	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
108	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
109	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
110	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
111	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
112	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
113	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
114	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
115	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
116	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
117	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
118	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
119	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0
120	2	232	82	5,6	27	222	58	102	40	9	945	2,08	66	221	0,42	0,51	84	980	1.304	0

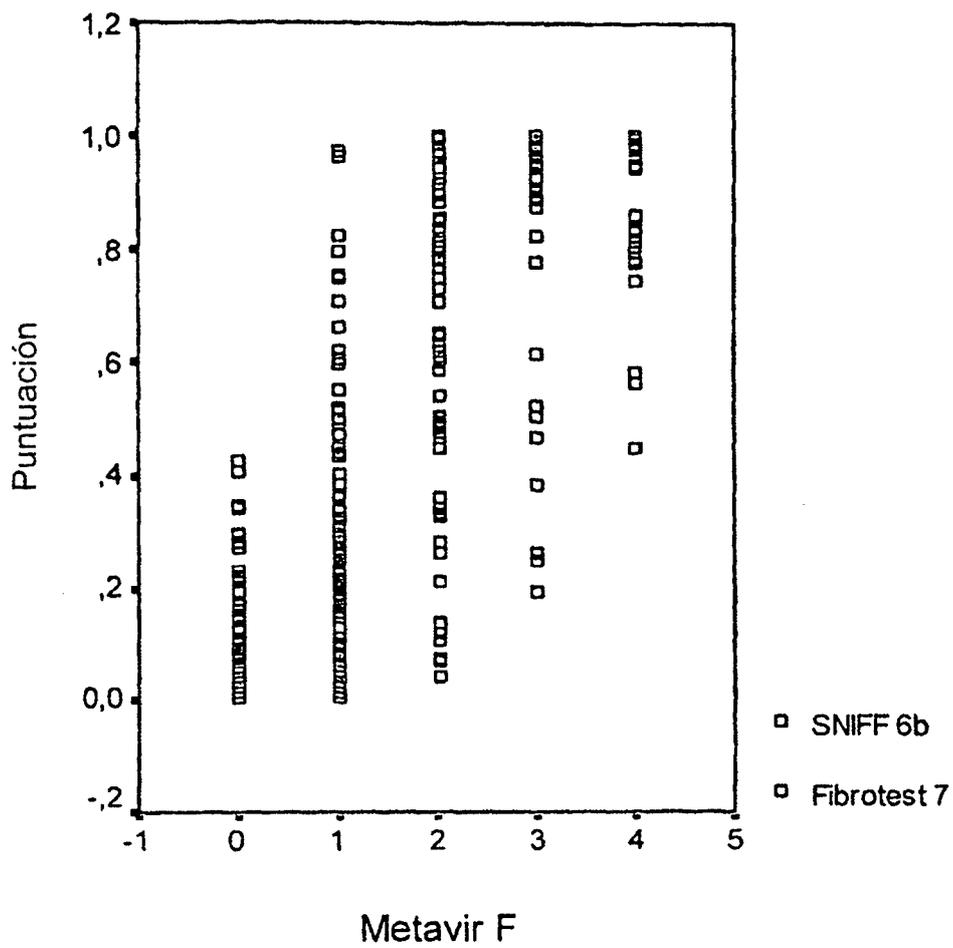
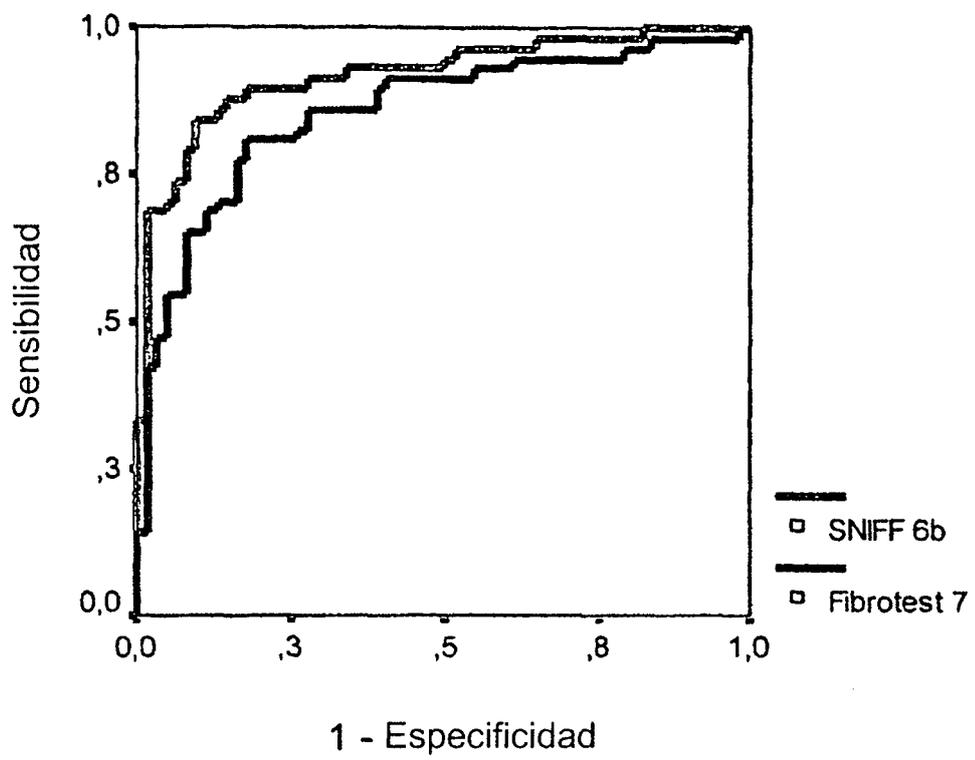


FIGURA 2/3

Curvas ROC



AUROC: 0.920 ± 0.036 vs 0.857 ± 0.026

FIGURA 3/3