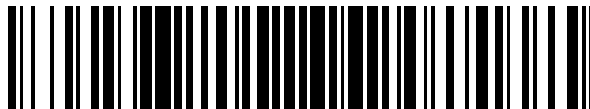


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 903**

21 Número de solicitud: 201330636

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**30.04.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.12.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070378**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y  
SALUD (33.3%)**

**Avda. Américo Vespucio nº 5 Bloque 2, 2ª planta  
Izq. Parque Científico y Tecnológico. Cartuja 93.  
41092 Sevilla ES;**

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA  
GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD DE  
SEVILLA (33.3%) y**

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROJAS GONZÁLEZ, Ana Isabel;**

**CANO GONZÁLEZ, David;**

**DELGADO SAINZ, Irene;**

**SORIA ESCOMS, Bernat y**

**MARTÍN BERMÚDEZ, Francisco**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

54 Título: **Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática. La presente invención describe un método de diagnóstico de la fibrosis hepática, que comprende detectar el nivel de expresión del gen GATA-4, o la cantidad de la proteína GATA-4, en la muestra biológica aislada de tejido hepático, y kit de diagnóstico.

ES 2 523 903 A1

## **DESCRIPCIÓN**

### **Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática.**

#### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico temprano de la fibrosis hepática, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuantitativo) específico, que se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes.

#### **10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad hepática crónica es actualmente una causa principal de hospitalización y mortalidad, especialmente en los pacientes que presentan coinfección por VIH y VHC o VHB. La incidencia de la enfermedad hepática continúa en crecimiento.

La fibrosis hepática es una respuesta fisiopatológica a daños crónicos producidos principalmente por el consumo abusivo de alcohol, infección vírica u obstrucción del conducto biliar. En el proceso fibrótico se produce la acumulación de componentes de matrix extracelular, tales como el colágeno y la laminina. El contenido en componentes de matrix extracelular está controlado por múltiples mecanismos moleculares y celulares, entre los que se incluyen la proliferación y activación de células productoras de colágeno. La mayor fuente de células productoras de colágeno y otros componentes de la matrix extracelular son las células estrelladas del hígado (*Hepatic Stellate Cells*, HSCs). En condiciones normales, las HSCs están en estado quiescente y almacenan vitamina A. Tras el daño hepático, estas células responden activándose y adquiriendo un forma miofibroblástica, entran en ciclo celular y comienzan a secretar componentes de matrix extracelular. La deposición de fibras de colágeno contribuye a formar cicatrices que desorganizan la estructura hepática afectando, por tanto, la función metabólica de los hepatocitos. La fibrosis hepática puede revertir si el agente causante del daño desaparece. En este caso, se desencadena un mecanismo de regeneración hepática, entre el que se incluye la reversión al estado inactivo de las HSCs y la replicación de los hepatocitos que reemplazan la pérdida de tejido hepático funcional. Sin embargo, si el daño hepático se mantiene, la progresión de la fibrosis hepática conlleva un estadio irreversible, conocido como cirrosis, en el que la excesiva acumulación

de componentes de la matriz extracelular distorsiona la arquitectura hepática y el hígado es incapaz de responder a las demandas metabólicas del organismo.

La fibrosis, por tanto, es un fenómeno frecuente en las enfermedades hepáticas y aunque inespecífica su exacta caracterización ayuda al diagnóstico. Su valoración incluye definir su ubicación, su distribución y su intensidad. La ubicación puede ser portal, periportal, intraacinar, zonal, sinusoidal, en puentes, o perinodular. En cuanto a la distribución, hay focal, difusa, lobar y segmentaria. La intensidad se gradúa en leve, moderada, intensa o acentuada, y cirrótica.

El diagnóstico preciso del grado de la fibrosis resulta necesario para determinar la progresión de la enfermedad hepática, efectuar un pronóstico y tomar decisiones terapéuticas.

Actualmente, la biopsia hepática es el método de referencia para determinar el grado de fibrosis hepática y ha sido recomendada extensamente para evaluar la necesidad de tratar a los pacientes con uno u otro tratamiento. No obstante, se han desarrollado procedimientos no invasivos para determinar los diferentes estadios de fibrosis hepática, que podemos dividir en dos categorías: los métodos de imagen, como la elastometría transitoria, y las pruebas basadas en la determinación sérica de marcadores biológicos.

Así, el Fibrotest es un índice que se calcula combinando 5 marcadores bioquímicos indirectos de fibrosis ajustados a la edad y el sexo. Estos marcadores se asocian con activación de las HSCs. Las HSCs son las principales células fibrogénicas del hígado. Actualmente las principales estrategias terapéuticas para prevenir o revertir la fibrosis hepática se basan en inhibir la activación o proliferación de las HSCs, o bien en inducir la apoptosis de las células activadas. El test APRI hace referencia al índice de la relación de la aspartato aminotransferasa (AST) y de las plaquetas. Está basado en el hecho que la fibrosis progresiva se asocia con disminución de la eliminación de AST y trombocitopenia. El FIB-4 es un índice sencillo que incluye la edad, los niveles de AST, de alaninoaminotransferasa (ALT), y el recuento plaquetario. El HGM1 y el HGM2, son dos simples índices de diagnóstico de la fibrosis hepática, basados en datos de laboratorio de rutina. El HGM-1 se basa en el recuento plaquetario, cifras de AST, y glucosa sérica en ayunas. El HGM-2 se basa en el recuento plaquetario, el índice INR, la fosfatasa alcalina (FA) y la AST.

Existen también una serie de marcadores séricos directos, como son el ácido hialurónico (zAH), el colágeno tipo IV, el propéptido de procolágeno III N-terminal procol (PIIINP), las metaloproteinasas de matriz (MPM) (enzimas proteolíticas secretadas por las HSCs que

intervienen en la destrucción de la matriz extracelular (MEC), los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz (ITMP), la laminina, o la glicoproteína 39 del cartílago humano (YKL-40).

5 El Grupo Europeo de Fibrosis Hepática (ELF, por sus siglas en inglés) ha desarrollado un algoritmo utilizando la edad, los niveles séricos de zAH, del PIIINP y del ITMP-1. Otro modelo de medición de la fibrosis hepática es Hepascore, elaborado a partir de los niveles de 4 marcadores séricos: bilirrubina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), zAH y alfa 2-macroglobulina, teniendo en cuenta la edad y el sexo.

10 Actualmente también se diagnostica la fibrosis hepática mediante elastografía transitoria (Fibroscan®). Consiste en una nueva técnica diagnóstica de la fibrosis hepática que utiliza una sonda que emite y recibe ondas de ultrasonidos. La velocidad de transmisión de estos ultrasonidos a través de un medio específico varía con la densidad y la elasticidad de dicho medio. Mediante una ecuación física, se puede informatizar la elasticidad hepática basándose en la velocidad de la transmisión, de tal manera que cuanto mayor es la  
15 velocidad, menor la elasticidad y mayor la rigidez del hígado (fibrosis), cualidad opuesta a la elasticidad

Actualmente la biopsia hepática es la técnica diagnóstica de elección para determinar la presencia y estado de la fibrosis hepática. Existen varios sistemas para cuantificar el estadio de fibrosis hepática mediante análisis histológicos de tinción con hematoxilina eosina o con  
20 Sirius red para teñir las fibras de colágeno de las muestras de biopsias. El más utilizado es el METAVIR (*METAVIR scoring system*). METAVIR mide la fibrosis en una escala de 0-4, donde F0 corresponde a ausencia de fibrosis; F1, fibrosis portal sin septos; F2, fibrosis portal con algunos septos; F3, numerosos septos sin cirrosis; y F4, cirrosis. Se considera fibrosis significativa cuando el estadio de fibrosis es igual o superior a F2 y fibrosis  
25 avanzada, cuando se informa un estadio de fibrosis igual o superior a F3. La detección de pacientes en estadio F2 o superior conlleva importantes implicaciones clínicas pues, en la mayoría de los casos, se considera el umbral para iniciar el tratamiento. Además de los análisis histológicos, se hace necesaria la búsqueda de marcadores que confirmen la presencia del proceso fibrótico.

30 El factor de transcripción GATA-4 o *GATA binding protein 4* (también conocido como *ASD2* y *VSD1*) es un miembro de la familia de factores de transcripción del tipo dedo de zinc que se expresa durante el desarrollo embrionario en diversos órganos como el corazón, el páncreas y el hígado, y su expresión continúa en estadios adultos. Los miembros de esta familia reconocen el motivo GATA, que está presente en los promotores de muchos genes.

Esta proteína se cree que regula los genes implicados en la embriogénesis y en la diferenciación y la función del miocardio. Las mutaciones en este gen se han asociado con defectos septales cardiacos. Este gen se localiza en el cromosoma 8 (8p23.1-p22) de humanos.

- 5 La detección de la presencia de fibrosis hepática y cuantificación de su magnitud son cruciales para tomar decisiones relacionadas con el manejo clínico de la enfermedad hepática. Puesto que los individuos que presentan una fibrosis leve o moderada son los que tienen mayor probabilidad de que el tratamiento sea más efectivo y de que la enfermedad se estabilice e incluso revierta, es necesario encontrar un marcador que permita detectar de
- 10 manera precoz a los pacientes con este tipo de fibrosis.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

- Los análisis inmunohistoquímicos realizados en el laboratorio de los inventores de la presente invención han mostrado que GATA-4 se expresa en las células estrelladas del hígado adulto en humanos en condiciones no patológicas. Sin embargo, la expresión de
- 15 GATA-4 disminuye en estadios fibróticos avanzados. Esta disminución es aún más dramática en estadios cirróticos de biopsias de hepatopatías por virus C y especialmente en hepatopatías alcohólicas.

- Los autores de la presente invención han desarrollado un método y un kit que emplea un marcador lo suficientemente sensible para discriminar entre los estadios tempranos y tardíos
- 20 de fibrosis y el estadio de cirrosis.

En los ejemplos de la presente invención se muestra la localización inmunohistoquímica de la proteína GATA-4 involucrada en la fibrosis hepática, en muestras de tejido de pacientes.

El patrón de tinción de esta proteína fue diferente entre los pacientes con distintos estadios de evolución de la fibrosis hepática y de cirrosis.

- 25 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del gen *GATA-4*, o de la proteína GATA-4, para el diagnóstico diferencial de la fibrosis y la cirrosis hepática.

*MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES Y MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL*

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la fibrosis y la cirrosis hepática, que comprende:

- 5 a) obtener una muestra biológica aislada que comprende células de un individuo, y
- b) detectar el nivel de expresión del gen *GATA-4*, y/o detectar la cantidad de proteína *GATA-4*, en la muestra aislada de (a).
- c) Comparar la expresión del gen del paso (b) con una cantidad de referencia.

10 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de la fibrosis y cirrosis hepática en un individuo, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

(d) diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con fibrosis portal sin septos (FI), cuando presente una expresión aumentada del gen *GATA-4* o una cantidad mayor de la proteína *GATA-4* en la muestra obtenida en (a), en relación a la cantidad de expresión detectada para dicho gen o dicha proteína en una población de pacientes de referencia. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la expresión aumentada del gen *GATA-4*, o una cantidad mayor de la proteína *GATA-4* se detecta en el núcleo de las células estrelladas. Más preferiblemente, el individuo del paso (a) presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de un 110% con respecto a los niveles de expresión en una población de pacientes (F0) de referencia.

En otra realización preferida, el individuo del paso (a) se diagnostica como un individuo con fibrosis portal con numerosos septos sin cirrosis (fibrosis portal con varios septos (FII) o muchos septos (FIII)), cuando presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de entre un 15% y un 25% menos que en un individuo de referencia. Más preferiblemente, presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de aproximadamente un 20% menos que el individuo de referencia (F0).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el individuo del paso (a) se diagnostica como un individuo con cirrosis (FIV), cuando presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de entre un 55% y un 65% menos que un individuo de referencia. Más preferiblemente, el individuo presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de aproximadamente un 60% menos que el individuo de referencia.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de tejido, preferiblemente de tejido hepático.

La detección de la expresión de los genes, o la detección de la cantidad de proteína, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

La medida de la concentración, preferiblemente de manera cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las proteínas a las que se traducen, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de los niveles de expresión del gen *GATA-4*, en la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con los niveles de expresión de los genes *GATA-4* de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser asistida por ordenador.

Los niveles de expresión de los genes o de las proteínas van a dar un determinado perfil de expresión génica o proteica. El término “nivel de expresión”, se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se

usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se entiende por “perfil de expresión génica” el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm producido por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por el gen *GATA-4*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión del gen se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción del gen *GATA-4*, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR), secuenciación directa de ARNm, análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ARN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ARN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas para el gen de *GATA-4* marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. Se entiende por perfil de expresión proteica al que se obtiene mediante la detección y/o cuantificación de la proteína o las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción del los genes *GATA-4*, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección cuantitativa de la expresión del gen *GATA-4* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas.

Más preferentemente, la detección de los niveles de expresión del gen *GATA-4* se realiza mediante Q-RT-PCR.

La PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR) es una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible que se puede usar de manera particular para la expresión del perfil génico en células y tejidos. Se puede usar cualquier procedimiento para la evaluación de los resultados de la RT-PCR y se puede preferir el procedimiento  $\Delta\Delta Ct$ . El procedimiento  $\Delta\Delta Ct$  se describe en detalle en Livak y col. (*Methods* 2001, 25:402-408). (Ct = Valores umbral del ciclo). Cuando se lleva la presente invención a la práctica, se deberá



usar preferiblemente el procedimiento  $\Delta\Delta\text{Ct}$  tal como describen Livak y col. (*Methods* 2001, 25:402-408). El procedimiento  $\Delta\Delta\text{Ct}$  implicará una "muestra del control" y una "muestra del sujeto". La "muestra del sujeto" es una muestra procedente del sujeto que se va a analizar. Por cada muestra, se incluyen un gen diana (aquí: el gen de interés) y un gen endógeno del control (tal como se describe a continuación) para la amplificación de la PCR a partir de alícuotas (normalmente diluciones en serie). Normalmente se usan varias réplicas de cada concentración diluida para derivar la eficacia de la amplificación. La eficacia de la amplificación de la PCR se puede definir como el porcentaje de amplificación (de 0 a 1). Durante la reacción de la qPCR, un software mide normalmente el número de ciclos de cada muestra en el cual la fluorescencia cruza una línea arbitraria (indicadora de la amplificación de la PCR), el umbral. Este punto de cruce es el valor Ct. Muestras más diluidas cruzarán a valores Ct posteriores. Para cuantificar la expresión génica de un gen particular, se divide el Ct de un ácido nucleico procedente del gen de interés por el Ct del ácido nucleico procedente del control endógeno en la misma muestra para normalizar la variación en la cantidad y calidad del ARN entre diferentes muestras y obtener la expresión relativa (con respecto al control endógeno) de cada una de la "muestra del sujeto" y de la "muestra del control". Opcionalmente, esto se lleva a cabo por duplicado, triplicado, cuadruplicado y de manera similar, respectivamente. Se puede obtener de manera adecuada un valor  $\Delta\text{Ct}$  del control calculando el promedio de los valores  $\Delta\text{Ct}$  obtenidos a partir de muestras de un grupo del control de varios individuos con los cuales se van a comparar los valores de la "muestra del sujeto". El grupo del control (del cual se calcula el valor promedio) consiste en los individuos adecuados a los respectivos fines (de comparación). La persona experta aprenderá de esta divulgación que un grupo de control adecuado es para un fin concreto. En una realización particular, la presente invención se puede llevar a la práctica omitiendo la determinación del valor  $\Delta\text{Ct}$  del grupo del control, es decir, determinar (solo) el valor  $\Delta\text{Ct}$  de la "muestra del sujeto" y a continuación comparando posteriormente este con el respectivo valor  $\Delta\text{Ct}$  promedio del control indicado en los ejemplos.

Como se ha dicho, otros métodos están también disponibles en el estado de la técnica, como por ejemplo la Transferencia Northern Blot, o los microarrays.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención la detección del producto de expresión del gen *GATA-4* se realiza mediante Transferencia Northern Blot. En otro aspecto de la invención, la detección del producto de expresión del gen *GATA-4* se realiza mediante microarrays.

El gen *GATA-4*, o *GATA binding protein 4* (también conocido como *ASD2*; *VSD1*) codifica un miembro de la familia GATA de los factores de transcripción de dedos de zinc. Los miembros de esta familia reconocen el motivo GATA, que está presente en los promotores de muchos genes. Esta proteína se cree que regula los genes implicados en la embriogénesis y en la diferenciación y la función del miocardio. Las mutaciones en este gen se han asociado con defectos septales cardiacos. Se encuentra en el cromosoma humano 8 (8p23.1-p22).

En el contexto de la presente invención, *GATA-4* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *GATA-4*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 2.

El término "diagnóstico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de discriminar entre individuos afectados o no por fibrosis hepática o cirrosis, y/o a la capacidad de discriminar entre los diferentes estadios de la fibrosis hepática (FI, FII, FIII o FIV). Particularmente, el kit de la invención permite discriminar entre el estadio I (FI), los estadios II y III (FII y FIII), y la cirrosis (FIV).

En la presente invención "pronóstico" se entiende como la evolución esperada de una enfermedad y se refiere a la valoración de la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad así como a la valoración de su inicio, estado de desarrollo, evolución, o de su regresión, y/o el pronóstico del curso de la enfermedad en el futuro. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. El término, sin embargo,

requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, 5 determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0.2, 0.1, 0.05.

Por "predicción de la respuesta" se entiende, en el contexto de la presente invención, la 10 determinación de la probabilidad de que el paciente responda de forma favorable o desfavorable a una terapia o a un tratamiento determinado, incluyendo el tratamiento quirúrgico. Especialmente, el término "predicción", como se usa aquí, se refiere a una evaluación individual de cualquier parámetro que pueda ser útil en determinar la evolución de un paciente. Como entenderán los expertos en la materia, la predicción de la respuesta 15 clínica al tratamiento, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados o evaluados. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos como que tienen una probabilidad aumentada de tener una respuesta positiva. El experto en la materia puede determinar fácilmente si un sujeto es estadísticamente significativo usando varias 20 herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p, prueba t de Student, prueba de Mann Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%>, al menos del 60%>, al menos del 70%>, al menos del 80%>, al menos del 90%), al menos del 95%>. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 ó 0,05. La predicción de la respuesta clínica 25 se puede hacer utilizando cualquier criterio de valoración usado en hepatología y conocido por el experto en la materia.

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal 30 y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la 35 determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de

Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

10 El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

15 La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva de los genes, en un grupo de individuos sanos, o de la expresión de los genes en el grupo de individuos antes de ser sometidos al tratamiento.

20 La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación entre los pacientes afectados por fibrosis o cirrosis hepática de los individuos sanos, la expresión constitutiva del gen o la cantidad de proteína detectada en un grupo control de individuos sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por fibrosis hepática en distintos estadios, el grupo control estará formado por un grupo de enfermos con fibrosis hepática en una determinada fase de desarrollo. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de 25 los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de individuos con fibrosis hepática, o fibrosis hepática en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas. En otra realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de los pacientes antes y después del tratamiento.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un agente modulador de gen *GATA-4*, en la elaboración de un medicamento para tratar un individuo diagnosticado de fibrosis o cirrosis hepática según los métodos de la invención, o alternativamente, a una composición farmacéutica que comprende un agente modulador del gen *GATA-4*, para tratar un individuo diagnosticado de fibrosis o cirrosis

hepática según los métodos de la invención. Preferiblemente, el agente modulador es un inhibidor de la expresión de dicho gen.

#### *Cuantificación de la proteína*

La cuantificación de la cantidad de proteína GATA-4 puede hacerse por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia, preferiblemente mediante técnicas inmunológicas.

En una realización más preferida, las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), o en cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, las técnicas inmunológicas comprenden el inmunomarcaje. En otra realización aún más preferida, el inmunomarcaje se selecciona de entre inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a enzimas, inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos, o citometría. Aún más preferiblemente, la citometría es citometría de flujo.

#### 15 *KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, MICROARRAY o MICROARRAY DE PROTEÍNAS Y USOS*

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de aquí en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar el nivel de expresión del gen *GATA-4*. En otra realización preferida el kit puede contener oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen, y/o capaces de hibridar con la secuencia del gen *GATA-4*, para la posterior amplificación por PCR. Más preferiblemente, la secuencia del gen *GATA-4* es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende al menos un anticuerpo anti-GATA-4. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización más preferida, el anticuerpo es monoclonal. En otra realización más preferida, el anticuerpo se encuentra marcado con un fluorocromo. Más preferiblemente el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar el nivel de expresión del gen *GATA-4*, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

5 Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

En el caso de (a) un kit adecuado para la RQ-PCR, una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible, se desea que el kit comprenda adicionalmente un cebador del oligonucleótido poliT además del (de los) oligonucleótido(s) del kit. Estos reactivos pueden estar comprendidos opcionalmente en el kit.

10

Una Transferencia Northern implica el uso de electroforesis para separar las muestras de ARN por tamaño y la posterior detección con un(os) oligonucleótido(s) (sonda de hibridación) complementaria con (parte de) la secuencia diana del ARN de interés.

15 Es también posible que el(los) oligonucleótido(s) estén inmovilizados en manchas sobre una superficie (preferiblemente sólida). En una de sus realizaciones, el kit comprende una micromatriz, o micromatriz de la invención. Una micromatriz de ARN es una matriz sobre un sustrato sólido (normalmente un porta de vidrio o una celda de una película fina de silicio) que evalúa grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables mediante sondas

20 específicas inmovilizadas sobre manchas sobre un sustrato sólido. Cada mancha contiene una secuencia específica de ácido nucleico, normalmente una secuencia de ADN, como sondas (o indicadores). Aunque el número de manchas no está limitado de manera alguna, existe una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los procedimientos de la invención. En una realización, dicha matriz personalizada comprende

25 cincuenta manchas o menos, tal como treinta manchas o menos, incluyendo veinte manchas o menos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una micromatriz que comprende oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes, y/o capaces de hibridar con la secuencia del gen *GATA-4*. Más preferiblemente, la secuencia del gen *GATA-4* es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm del gen *GATA-4*. Más preferiblemente, la secuencia del gen *GATA-4* es la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie de un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo 5 fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean 10 aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda 15 es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un microarray de proteínas, de ahora en adelante microarray de proteínas de la invención, que comprende anticuerpos anti- GATA-4. Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero 20 o tejido.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo, la micromatriz, o el microarray de la invención, de la para la obtención de datos útiles en el diagnóstico de la fibrosis o de la cirrosis hepática.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un 25 ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de 30 cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos

(ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que  
10 sean limitativos de la presente invención.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Fig. 1. Análisis histológicos de cortes de tejidos en parafina teñidos con Sirius red procedentes de biopsias de hígado humano de pacientes sanos (normal), con fibrosis tipo I (FI), fibrosis tipo II-III (FII-III) y cirrosis.** Las fibras de colágeno teñidas con sirius red que reflejan el grado de fibrosis y cirrosis se visualizan en gris oscuro/negro.  
15

**Fig. 2. Análisis inmunohistoquímicos de cortes de tejido en parafina procedentes de biopsias de hígado humano de pacientes sanos (normal), con fibrosis tipo I (FI), fibrosis tipo II-III, (FII-III) y cirrosis.** La inmunodetección de GATA-4 en el núcleo de las células estrelladas se observa como un punteado negro en los espacios sinusoidales entre los hepatocitos.  
20

**Fig. 3. Análisis cuantitativo de niveles de ARN mensajero del gen GATA-4 en tejidos hepáticos procedentes de biopsias de hígado humano de pacientes sanos (normal), con fibrosis tipo I (FI), fibrosis tipo II-III (FII-III) y cirrosis.**

#### **EJEMPLOS DE LA INVENCION** 25

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de la invención para obtener datos útiles en el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática.



## **Metodología**

### *Obtención y preparación de muestras de hígado humano*

Las muestras de hígado humano fueron obtenidas por biopsias en cuña o por hepatotectomía de trasplante. Se obtuvo muestras de:

5 -5 pacientes sanos por biopsia rutinaria

-5 muestras de pacientes con fibrosis hepática de etiología indeterminada. Las fibrosis fueron clasificadas según el sistema METAVIR como:

Hígado en fase de Fibrosis (1 muestra)

Fibrosis portal de tipo leve o residual (2 muestras)

10 Fibrosis portal pre-cirrótica estadio III (2 muestras)

-5 muestras de cirrosis hepáticas, 3 de ellas de etiología alcohólica y 2 de ellas de etiología vírica causada por el virus de la hepatitis C.

15 Todas las muestras fueron fijadas en formalina neutra al 10% durante 36 horas aproximadamente. Las muestras fijadas fueron embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5 µm de espesor para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico. Los cortes de tejido hepático fueron montados en portaobjetos previamente xilanizados con 2% de 3- amino- propil- trietoxi- xilano (APES) (número de catálogo A3648 Sigma Aldrich) e incubados a 60°C durante 12 horas.

### *Análisis histológico*

20 Las muestras fueron desparafinadas mediante sucesivos lavados en xileno y etanol a distintas concentraciones y posteriormente teñidas siguiendo el siguiente protocolo:

1. Sumergir las muestras en xileno: 10 minutos
2. Sumergir las muestras en Etanol 100%: 5 minutos
3. Sumergir las muestras en Etanol 90%: 5 minutos
- 25 4. Sumergir las muestras en Etanol 70%: 5 minutos
5. Lavar las muestras con agua destilada: 10 minutos.
6. Sumergir las muestras en hematoxilina férrica de Weigert (HT1079, Sigma Aldrich) durante 8 minutos.

7. Realizar lavados continuos de las muestras con agua del grifo (agua corriente no destilada) durante 10 minutos.
  8. Sumergir las muestras en solución picro-sirius red durante una hora (La solución picro-sirius red se prepara de la siguiente forma: 0.5 g de Sirius Red (Direct Red 80, número catálogo 365548, Sigma Aldrich) en 500 ml de ácido pícrico (número catálogo P6744, Sigma Aldrich).
  9. Realizar dos lavados de 5 segundos cada uno en agua ácida (el agua ácida se prepara añadiendo 5ml de ácido acético en 995 ml de agua destilada).
  10. Deshidratar los tejidos pasando 5 minutos en 70% etanol, 5 minutos en 90% etanol y 5 minutos en 100% etanol.
  11. Sumergir las muestras en xileno durante 5 minutos.
  12. Montar las muestras añadiendo medio de montaje DPX (número catálogo HT1079, Prolabo) y cubriendo con cubreobjetos.
- 15 Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Leica AF6000 con cámara DFC500 usando luz polarizada y objetivos de 10x.

#### *Análisis inmunohistoquímicos*

Las muestras desparafinadas obtenidas en el paso 5 del protocolo anterior fueron sujetas a análisis inmunohistoquímicos siguiendo el siguiente protocolo:

- 20 1. Las muestras fueron inmersas en una solución de citrato 10mM a pH 6 y calentadas en una autoclave a 121°C durante 40 minutos para desenmascarar los epítomos. (Citrato de Sodio 10mM, S-4611, Sigma Aldrich. Para alcanzar el pH 6 se usa una solución de ácido cítrico, C-0759, Sigma Aldrich).
- 25 2. Tras el calentamiento de las muestras, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con agua destilada y se incubaron en 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido en agua destilada durante 10 minutos para bloquear la actividad peroxidada endógena.
- 30 3. A continuación las muestras fueron bloqueadas en 3 % Donkey Serum (número catálogo D9663, Sigma Aldrich) diluido en solución Phosphate Buffered Saline (PBS, Número catálogo P5368, Sigma Aldrich) y añadiendo 0.2% Triton X-100 (número de catálogo A4975, AppliChem) durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Después de la incubación de bloqueo, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GATA-4 (G-4, Sc-25310, Santa Cruz Biotechnologies) usando una dilución 1:50 a 4°C durante toda la noche. El anticuerpo fue diluido en PBS+3% NGS+0.2% Tritón X-100.
5. Tras la incubación con el anticuerpo, las muestras se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS y fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse (número de catálogo BA-2020, Vector Laboratories, Inc) a una dilución 1:300 en PBS+3% NGS+0.2% Tritón X-100 a temperatura ambiente durante 1 hora.
6. A continuación, las muestras se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos cada lavado y finalmente lavadas en agua destilada e incubadas con el sistema de inmunoperoxidasa Vectastain Elite ABC (número catálogo PK-6100, Vector Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante.
7. Las muestras se volvieron a lavar tres veces con PBS y se revelaron usando diaminobencidina (DAB) siguiendo las instrucciones del kit Peroxidase Substrate DAB kit (número catálogo sk-4100, Vector Laboratories, Inc)
8. Las muestras fueron deshidratadas en pases de 5 minutos cada uno en etanol 90%, etanol 70%, etanol 100% y xileno y finalmente montadas con DPX para fotografiarlas en el microscopio Leica AF6000 con cámara DFC500 usando objetivos de 10x y de 20x.

#### 20 *Análisis cuantitativo de ARN mensajero*

El ARN total a partir de muestras de biopsias de hígados de pacientes sanos (F0), con fibrosis tipo I, fibrosis tipo II-III o de cirrosis fue obtenida usando el kit mirVana miRNA isolation kit (Ambion, número de catálogo 1560). En todos los casos se partió de 10-13 cortes de 20 micras de grosor de cada una de las muestras hepáticas frescas. Se obtuvo 25 biopsias de 5 pacientes sanos (F0), 2 pacientes con fibrosis tipo I, un paciente con fibrosis con tipo II-III y 5 pacientes con cirrosis. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron usando el kit QUANTITEC REVERSE TRANSCRIPTION (Qiagen, número de catálogo 205313). Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó Taqman gene expression master mix (Applied Biosystem, número de catálogo 436016) y sondas comerciales Taqman 30 para la amplificación del gen GATA-4 (*Gata-4* Hs00171403\_m1 Applied Biosystem) y para la amplificación del gen de referencia interna  $\beta$ -actina (Hs03023880\_g1 Applied Biosystem). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador Real Time PCR 700 de Applied Biosystem. El asterisco indica significancia estadística entre los niveles de expresión

de *GATA-4* de pacientes normales y pacientes cirróticos con una probabilidad de  $p=0.05$  en un Test de Student para muestras no pareadas. La cuantificación de los niveles de expresión de *GATA-4* en las han sido realizados por triplicado para cada muestra y en tres experimentos independientes.

## REIVINDICACIONES

- 1.- El uso del gen *GATA-4*, o de la proteína *GATA-4*, para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática.
- 2.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática, que comprende:
  - a. obtener una muestra biológica aislada que comprende células de un individuo, y
  - b. detectar el nivel de expresión del gen *GATA-4*, o la cantidad de la proteína *GATA-4*, en la muestra aislada de (a), y
  - c. comparar la expresión del gen obtenida en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 3.- Un método para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática, que comprende los pasos (a) – (c) según la reivindicación 2, y además comprende:
  - (d) diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con fibrosis hepática tipo I, cuando presente una expresión aumentada del gen *GATA-4* o una cantidad mayor de la proteína *GATA-4* en la muestra obtenida en (a), en relación a la cantidad de expresión detectada para dicho gen o dicha proteína en una población de pacientes (F0) de referencia.
- 4.- El método según la reivindicación 3, donde el individuo del paso (a) presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de un 110% con respecto a los niveles de expresión en una población de pacientes (F0) de referencia.
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, que además comprende diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con fibrosis portal con numerosos septos sin cirrosis (FII-FIII), cuando presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de entre un 15% y un 25% menos que en un individuo de referencia.
- 6.- El método según la reivindicación 5, donde el individuo del paso (a) presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de aproximadamente un 20% menos que en un individuo de referencia.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, que además comprende diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con cirrosis (FIV), cuando presenta

un nivel de expresión del gen *GATA-4* de entre un 55% y un 65% menos que un individuo de referencia.

5 8.- El método según la reivindicación 7, donde el individuo del paso (a) presenta un nivel de expresión del gen *GATA-4* de aproximadamente un 60% menos que en un individuo de referencia.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de tejido hepático.

10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde la detección de los niveles de expresión del gen *GATA-4* se realiza mediante Q-RT-PCR.

10 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde la identificación de la cantidad de proteína *GATA-4*, se realiza mediante técnicas inmunológicas.

15 12.- El método según la reivindicación 11, donde las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA (*Enzyme Linked Immunoassorbent Assay*), o en cualquiera de sus combinaciones.

13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde las técnicas inmunológicas comprenden el inmunomarcaje.

20 14.- El método según la reivindicación 13, donde el inmunomarcaje se selecciona de entre inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a enzimas, inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos, o citometría.

15.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar el nivel de expresión del gen *GATA-4* o la cantidad de proteína *GATA-4*.

16.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende un anticuerpo anti-*GATA-4*.

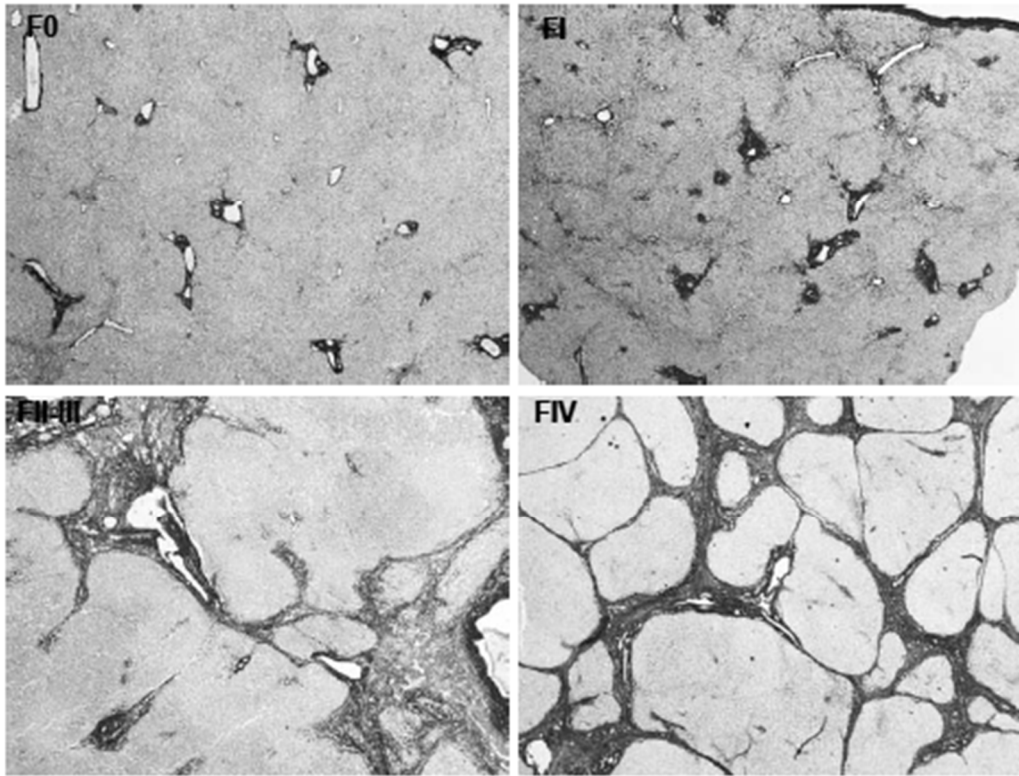
25 17.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15-16, donde el anticuerpo es monoclonal.

18.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde el anticuerpo se encuentra marcado con un fluorocromo.

19.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

5 20.- El uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 15-19, para el diagnóstico diferencial de la fibrosis hepática, principalmente de fibrosis tipo I, de fibrosis tipo II-III, y de cirrosis.

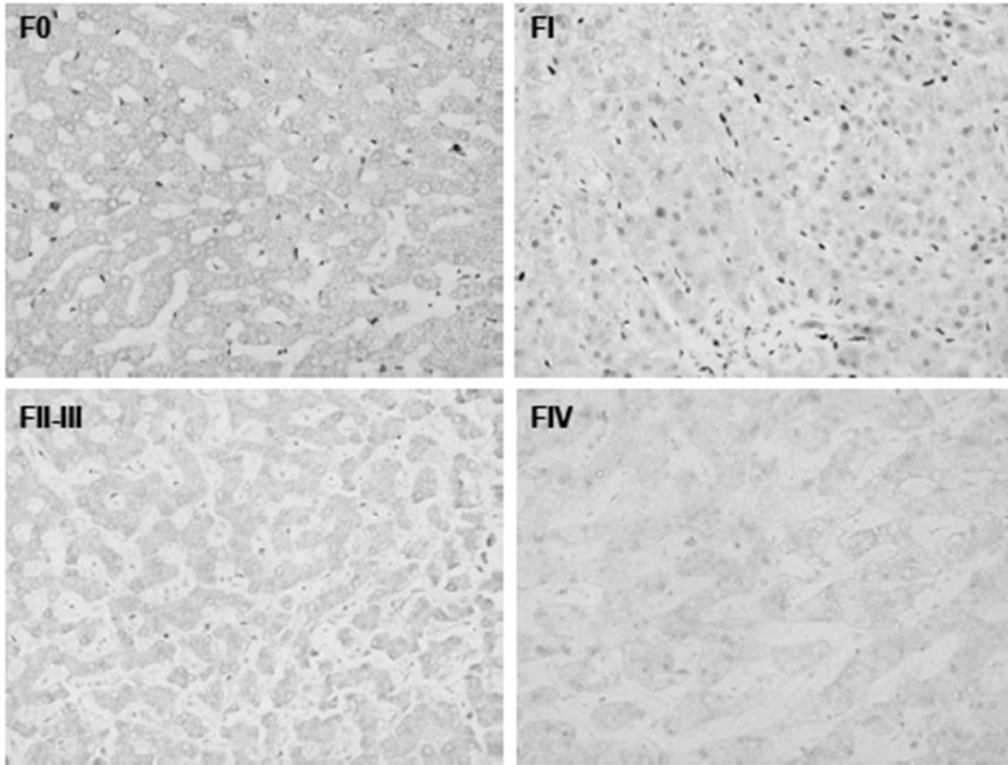
**Sirius red**



**Fig. 1**



**Proteína GATA4**



**Fig.2**

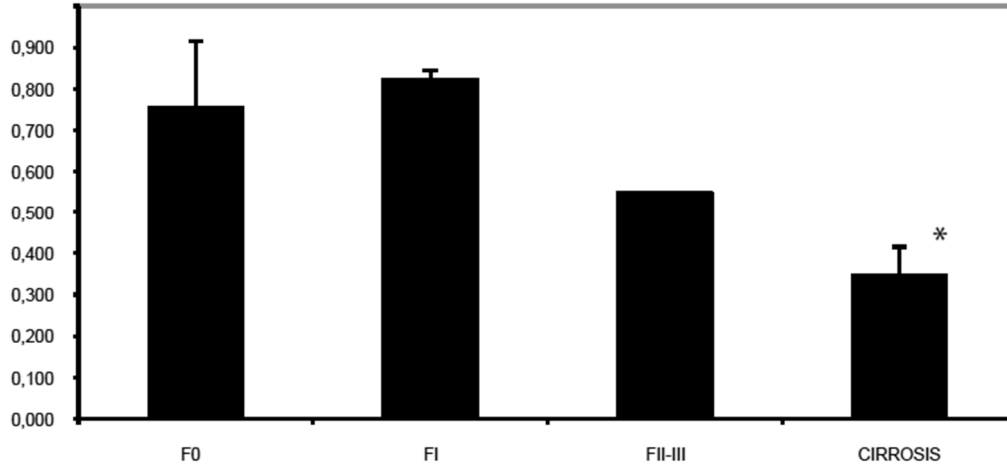


Fig.3

# ES 2 523 903 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud  
Fundación Pública Andaluza para la Gestión de la Investigación en  
Salud de Sevilla  
Universidad Pablo de Olavide

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico  
diferencial de la fibrosis hepática.

<130> P-06370

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Tyr Glu Ala Gly Gly Pro Gly Ala Phe Met His Gly Ala Gly Ala  
20 25 30

Ala Ser Ser Pro Val Tyr Val Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val  
35 40 45

Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly  
50 55 60

Gly Ala Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro  
65 70 75 80

Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Asp Gly  
85 90 95

Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly  
100 105 110

Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu  
115 120 125

Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala  
130 135 140

# ES 2 523 903 A1

Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser  
 145 150 155 160

Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala  
 165 170 175

Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu  
 180 185 190

Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe  
 195 200 205

Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser  
 210 215 220

Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr Leu Cys Asn Ala  
 225 230 235 240

Cys Gly Leu Tyr His Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg Pro Leu Ile Lys  
 245 250 255

Pro Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly Leu Ser Cys Ala  
 260 265 270

Asn Cys Gln Thr Thr Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg Asn Ala Glu Gly  
 275 280 285

Glu Pro Val Cys Asn Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys Leu His Gly Val  
 290 295 300

Pro Arg Pro Leu Ala Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Arg  
 305 310 315 320

Lys Pro Lys Asn Leu Asn Lys Ser Lys Thr Pro Ala Ala Pro Ser Gly  
 325 330 335

Ser Glu Ser Leu Pro Pro Ala Ser Gly Ala Ser Ser Asn Ser Ser Asn  
 340 345 350

Ala Thr Thr Ser Ser Ser Glu Glu Met Arg Pro Ile Lys Thr Glu Pro  
 355 360 365

# ES 2 523 903 A1

Gly Leu Ser Ser His Tyr Gly His Ser Ser Ser Val Ser Gln Thr Phe  
 370 375 380

Ser Val Ser Ala Met Ser Gly His Gly Pro Ser Ile His Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Ser Ala Leu Lys Leu Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Pro Val Ser Gln  
 405 410 415

Ser Pro Gln Thr Ser Ser Lys Gln Asp Ser Trp Asn Ser Leu Val Leu  
 420 425 430

Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala  
 435 440

<210> 2  
 <211> 3419  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ttggaggcgg ccggcgcagg ggccgcgaga ggcttcgtcg ccgctgcagc tccgggggct	60
cccaggggag cgtgcgcgga acctccaggc ccagcaggac cccggctgcg gcgaggagga	120
aggagccagc ctagcagctt ctgcgcctgt ggccgcgggt gtccctggagg cctctcggtg	180
tgacgagtgg gggacccgaa ggctcgtgcg ccacctccag gcctggacgc tgcctccgt	240
cttctgcccc caataggtgc gccggacctt caggccctgg ggtgaattca gctgctccta	300
catcagcttc cggaaccacc aaaaattcaa attgggattt tccggagtaa acaagagcct	360
agagcccttt gctcaatgct ggatttaata cgtatatatt ttaagcgag ttggtttttt	420
cccctttgat ttttgatcct cgcgacagtt cctcccacgc atattatcgt tgttgccgtc	480
gttttctctc cccgcgtggc tccttgacct gcgagggaga gagaggacac cgaagccggg	540
agctcgcagg gaccatgtat cagagcttgg ccatggccgc caaccacggg ccgcccccg	600
gtgcctacga ggcgggcggc cccgggcctt tcatgcacgg cgcgggcgcc gcgtcctcgc	660
cagtctacgt gccacaccg cgggtgcctt cctccgtgct gggcctgtcc tacctccagg	720
gcggaggcgc gggctctgcg tccggaggcg cctcgggcgg cagctccggt ggggccgct	780
ctggtgcggg gcccgggacc cagcagggca gcccgggatg gagccaggcg ggagccgacg	840
gagccgctta cccccgccg ccggtgtcgc cgcgcttctc cttcccgggg accaccgggt	900
ccctggcggc cgccgcgcc gctgccgcg cccgggaagc tgcggcctac agcagtggcg	960

# ES 2 523 903 A1

gcgagcggc ggggtcgggc ctggcgggcc gcgagcagta cgggcgcgcc ggcttcgcgg	1020
gctcctactc cagcccctac ccggcttaca tggccgacgt gggcgcgtcc tgggccgcag	1080
ccgccgccgc ctccgccggc cccttcgaca gcccggctct gcacagcctg cccggccggg	1140
ccaaccggc cgcccgacac cccaatctcg atatgtttga cgacttctca gaaggcagag	1200
agtgtgtcaa ctgtggggct atgtccaccc cgctctggag gcgagatggg acgggtcact	1260
atctgtgcaa cgcctgcggc ctctaccaca agatgaacgg catcaaccgg ccgctcatca	1320
agcctcagcg ccggctgtcc gcctcccgcc gagtgggctt ctctgtgccc aactgccaga	1380
ccaccaccac cacgctgtgg cgccgcaatg cggagggcga gcctgtgtgc aatgcctgcg	1440
gcctctacat gaagctccac ggggtcccca ggcctcttgc aatgcggaaa gaggggatcc	1500
aaaccagaaa acggaagccc aagaacctga ataaatctaa gacaccagca gctcctcag	1560
gcagtgagag cttcctccc gccagcgggtg cttccagcaa ctccagcaac gccaccacca	1620
gcagcagcga ggagatgcgt cccatcaaga cggagcctgg cctgtcatct cactacgggc	1680
acagcagctc cgtgtcccag acgttctcag tcagtgcgat gtctggccat gggccctcca	1740
tccaccctgt cctctcggcc ctgaagctct ccccacaagg ctatgcgtct cccgtcagcc	1800
agtctccaca gaccagctcc aagcaggact cttggaacag cctggtcttg gccgacagtc	1860
acggggacat aatcactgcg taatcttccc tcttccctcc tcaaattcct gcacggacct	1920
gggacttggg ggatagcaaa gaaggaggcc ctgggctccc aggggccggc ctctctgccc	1980
tggtaatgac tccagaacaa caactgggaa gaaacttgaa gtcgacaatc tggttagggg	2040
aagcgggtgt tggatcttct cagatgcctt tacacgctga tgggactgga gggagcccac	2100
ccttcagcac gagcactcag catctctcct gtgagttgga gacttctttc ccaagatgtc	2160
cttgtcccct gcgttcccca ctgtggccta gaccgtgggt tttgcattgt gtttctagca	2220
ccgaggatct gagaacaagc ggagggccgg gccctgggac ccctgctcca gccgaaatga	2280
cggcatctgt ttgccatgta cctggatgcg acgggccctt ggggacaggc ccttgcccca	2340
tccatccgct tgaggcatgg caccgcctg catccctaata accaaatctg actccaaaat	2400
tgtggggtgt gacatacaag tgactgaaca cttcctgggg agctacaggg gacttaacc	2460
caccacagca cagcctcatc aaaatgcagc tggcaacttc tccccagggt gccttcccc	2520
tgctgccggc ctttgctcct tcaattccaa catctctcaa aataaaaatc cctcttcccg	2580
ctctgagcga ttcagctctg cccgcagctt gtacatgtct ctcccctggc aaaacaagag	2640
ctgggtagtt tagccaaacg gcaccccctc gagttcactg cagacccttc gttcaccgtg	2700

## ES 2 523 903 A1

tcacacatag aggggttctg agtaagaaca aaacgttctg ctgctcaagc cagtctggca	2760
agcactcagc ccagcctcga ggtccttctg gggagagtgt aagtggacag agtcctggtc	2820
agggggcagg agtgtcccaa gggctggccc acctgctgtc tgtctgctcc tcctagccct	2880
tggtcagatg gcagccagag tccctcagga cctgcagcct cgccccggca gaagtctttt	2940
gtccaggagg caaaaagcca gagattctgc aacacgaatt cgaagcaaac aacacaaca	3000
caacagaatt cctggaaaga agacgactgc taagacacgg cagggggggc tggagggagc	3060
ctccgactct gagctgctcc gggatctgcc gcgttctcct ctgcacattg ctgtttctgc	3120
ccctgatgct ggagctcaag gagactcctt cctctttctc agcagagctg tagctgactg	3180
tggcattact acgcctcccc acacgcccag acccctcact ccaaaatcct actggctgta	3240
gcagagaata cttttgaacc aagattctgt tttaatcatc atttacattg ttttcttcca	3300
aaggccccct cgtataccct ccctaaccba caaacctggt aacattgtct taaggtgaaa	3360
tggctggaat atcagtatct aactaataaa tttatctgta ttcctcttaa aaaaaaaaa	3419