

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 160**

51 Int. Cl.:

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2004 E 04701959 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 1583968**

54 Título: **Un marcador de suero para medir fibrosis hepática**

30 Prioridad:

14.01.2003 EP 03100058
11.12.2003 EP 03104651

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2015

73 Titular/es:

VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Zwijnaarde, BE y
UNIVERSITEIT GENT (50.0%)

72 Inventor/es:

CONTRERAS, ROLAND y
CALLEWAERT, NICO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 543 160 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

Un marcador de suero para medir fibrosis hepática

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona métodos y kits para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en mamíferos. El marcador de diagnóstico se basa en el perfilado e identificación de hidratos de carbono de diagnóstico presentes en un líquido corporal tal como suero sanguíneo.

10

Antecedentes de la invención

La fibrosis hepática se caracteriza por la deposición de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular y su organización en polímeros complejos, que son insolubles e inducen la pérdida de la arquitectura del hígado. El colágeno y las proteínas de la matriz que constituyen la fibrosis se producen en gran parte por las células estrelladas hepáticas activadas. Las células estrelladas se activan de un fenotipo de lipocito quiescente a un fenotipo fibroblástico. La activación se produce en 2 fases: inicialmente, la activación de células estrelladas por citocinas (especialmente TGF-beta), quimiocinas y otras moléculas de señalización inducidas por el proceso inflamatorio, seguido de transformación de las células estrelladas en un fenotipo miofibroblástico, en el que la célula puede proliferar, atraer leucocitos y producir colágeno extracelular y proteínas de la matriz. En todas las formas de hepatitis crónica, la fibrosis activa empieza alrededor de las áreas portales (zona periportal o fibrosis de zona 1, etapa de fibrosis 1 de Metavir) y gradualmente se extiende fuera en los lóbulos hacia las venas centrales (zona 3), con formación de septo (etapa de fibrosis 2 de Metavir). Entonces, se produce la conexión por puente (etapa de fibrosis 3 de Metavir). La etapa final de la fibrosis (etapa de fibrosis 4 de Metavir) es la cirrosis temprana: amplia fibrosis que conecta las áreas portales y centrales, acompañada de regeneración nodular del parénquima del hígado. También se usan frecuentemente otras puntuaciones histológicas, aparte del sistema de Metavir, tales como la puntuación HAI. La puntuación HAI distingue sin fibrosis (grado 0) de fibrosis no en puente leve (grado 1); fibrosis en puente (grado 3) y cirrosis temprana (grado 4). La fibrosis hepática acompaña a la mayoría de los trastornos crónicos del hígado y se caracteriza por el crecimiento de tejido cicatricial entre áreas de tejido funcional del hígado. Como tal, el crecimiento de tejido conjuntivo es una reacción normal a la lesión del tejido, pero puede 'pasarse', produciendo fibrosis hepática. La tasa de progresión de la fibrosis es el distintivo que define la enfermedad de enfermedades hepáticas crónicas, ya que es esta progresión de la fibrosis la que por último lugar conduce a la distorsión arquitectónica del hígado, y a la cirrosis. Es importante evaluar la etapa de la fibrosis y la tasa de progresión de la fibrosis, ya que algunos pacientes con enfermedad hepática crónica progresan rápidamente, terminando finalmente con cirrosis y las complicaciones potencialmente mortales asociadas, mientras que otros progresan muy lentamente, si lo hacen, y nunca podrían padecer complicaciones asociadas al hígado. Por tanto, generalmente se realiza biopsia del hígado en pacientes hepáticos crónicos recién diagnosticados. Sin embargo, ésta es una técnica de diagnóstico invasiva, frecuentemente dolorosa, que algunas veces va acompañada de complicaciones graves. Además, aunque se considera que es el 'estándar de oro' para la estadificación de la fibrosis, la biopsia del hígado podría submuestrear el estado verdadero de la enfermedad del hígado, ya que solo se sondea una pequeña área. Así, la biopsia del hígado no es muy adecuada como herramienta de seguimiento rutinaria. Una herramienta ideal para el seguimiento de la fibrosis hepática sería un biomarcador clínico no invasivo, cuyos valores medidos debieran correlacionarse con la etapa de fibrosis (la progresión de la fibrosis hepática). Se han evaluado varios marcadores y conjuntos de marcadores hacia este objetivo, pero ninguno de ellos cumple completamente estos requisitos. Por ejemplo, se han usado componentes de la matriz extracelular presentes en suero, siendo el ácido hialurónico del suero aparentemente el más fiable. Sin embargo, el consenso que parece surgir de los cada vez más estudios que implican a este marcador es que puede ser bastante fiable para excluir cirrosis en varios pacientes (alto valor predictivo negativo), aunque su exactitud en la detección de cirrosis sea baja (aproximadamente el 30 % de sensibilidad). Recientemente se han estudiado mucho modelos de regresión logística binaria tales como {Fibrotest}, basados en una gama de análisis de bioquímica clínica, para estos fines (ref. 14,15 y documento WO0216949). Sin embargo, estos marcadores tienen una baja sensibilidad a niveles >95 % de especificidad que se requeriría para obviar la necesidad de biopsia en pacientes con enfermedad del hígado crónica, o para detectar fiablemente la aparición de cirrosis temprana en una configuración de seguimiento. Es evidente que se necesitan marcadores de suero adicionales con alta especificidad y buena sensibilidad para la monitorización no invasiva de fibrosis hepática y su progresión. En la presente invención, los presentes inventores han desarrollado un método de 'glicómica clínica' que usa un ciclador térmico de PCR estándar y un secuenciador de ADN automático/analizador de fragmentos para generar rápidamente perfiles de alta resolución de las modificaciones postraduccionales de N-glicanos presentes en las proteínas en el suero del paciente. Los presentes inventores muestran que el N-glicoma en suero da un biomarcador que distingue pacientes con enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica con el 79 % de sensibilidad y el 86 % de especificidad. Y, lo que es más importante, cuando el nuevo biomarcador de los presentes inventores se usa junto con el biomarcador {Fibrotest} basado en bioquímica clínica (que detecta cirrosis temprana en la presente invención con el 92 % de sensibilidad y el 76 % de especificidad), la especificidad por la diferenciación entre casos de fibrosis y cirrosis temprana mejoró al 100 %, mientras que retuvo una sensibilidad del 75 %.

65 **Breve descripción de las figuras y tablas**

Fig. 1 Ejemplos del perfil de N-glicanos de proteínas totales en suero.

El panel superior contiene una referencia de malto-oligosacárido. El segundo panel muestra un electroferograma típico de los N-glicanos desialilados derivados de las proteínas en una muestra de suero de control. Nueve picos son claramente visibles en el intervalo de detección completo, cinco más en la ampliación 10x de la última parte del electroferograma. La altura de estos 14 picos se usó para obtener una descripción numérica de los perfiles de todas las muestras en este estudio. El tercer panel muestra un electroferograma representativo obtenido de un caso de cirrosis. Las estructuras de los N-glicanos que son de relevancia para este estudio se muestran debajo de los paneles, y los picos que se encontró que eran de relevancia particular para los marcadores de cirrosis están recuadrados. Símbolos de la unidad de monosacárido (también válidos para la Fig. 5): ○ GlcNAc ligada en β; ● Gal ligada en β; □ Man ligada en α; ■ Man ligada en β; △ Fuc ligada en α-1,6.

Fig. 2 Tendencias en las variables de diagnóstico derivadas.

Las muestras de suero se clasificaron en 9 grupos clínicamente relevantes. Se derivaron tres variables de diagnóstico de perfiles como se muestra en la Fig. 1: Log(Pico 1/Pico 8), Log(Pico 2/Pico 8) y Log (Pico 7/Pico 8). La última se renombró GlycoCirrhoTest debido a su alta eficiencia de diagnóstico para la cirrosis. Obsérvese que la escala en las ordenadas es logarítmica. Las tres variables muestran una clara tendencia hacia mayores valores promedio con gravedad creciente de la enfermedad del hígado, y especialmente así en cirrosis (las barras de error son los intervalos de confianza del 95 % para la media).

Fig. 3 Eficiencia de clasificación de las tres variables derivadas usando análisis ROC.

a) Se realizó el análisis de la curva ROC para evaluar la eficiencia de las tres variables mostradas en la Fig. 2 en diferenciar el grupo de muestras con cirrosis leve y el grupo con enfermedad del hígado crónica pre-cirrótica. Los valores de corte determinados de GlycoCirrhoTest y de las curvas ROC de {Fibrotest} se usaron en la sección b de esta figura para dividir los campos de los diagramas de dispersión bidimensionales en cuadrantes. b) Diagramas de dispersión bidimensionales que clasifican el grupo de muestras de cirrosis y el grupo de enfermedad del hígado crónica pre-cirrótica. Panel superior: Se detectan casos de cirrosis bioquímicamente compensada con/sin HCC con 75 % de sensibilidad y 100 % de especificidad. Panel central: Se detectan casos de cirrosis bioquímicamente descompensada con/sin CHC con 100 % de sensibilidad. c) Prueba del corte de GlycoCirrhoTest para una muestra de población general (donantes de sangre de la Cruz Roja) y de pacientes con enfermedad autoinmunitaria no hepática. Véase el texto para la explicación. Estos individuos normalmente no son candidatos para biopsia, pero se estudiaron para aprender sobre la posible interferencia de cambios en la glucosilación de IgG, típicos de ciertas enfermedades autoinmunitarias.

Fig. 4 Valores de algunos de los marcados de glicoma aumentan gradualmente con la etapa de la fibrosis.

Los datos para los tres marcadores derivados del glicoma se representaron contra la etapa de la fibrosis. Se agruparon casos con etapa F0 y F1 (sin fibrosis o fibrosis portal), ya que solo hubo 4 casos de F0, y ya que esta agrupación es clínicamente significativa porque normalmente no se inicia tratamiento anti-VHC para estos pacientes. La etapa F4+ indica cirrosis bioquímicamente descompensada. Se generaron líneas de tendencia por la regresión de Lowess no paramétrica. Las líneas horizontales en los dos paneles inferiores representan los valores de corte determinados por ROC para la detección de cirrosis. Obsérvese la relativa estabilidad de GlycoCirrhoTest de F0/F1 hasta F3, solo aumentando a partir de F4. Obsérvese también el comportamiento sigmoidal esperado del modelo {Fibrotest}. De forma interesante, tanto Log(Pico 1/Pico 2) como especialmente Log(Pico 2/Pico 8) aumentan gradualmente con la etapa de la fibrosis. Para Log(Pico 2/Pico 8), la correlación por rangos de Spearman lineal da un alto coeficiente de correlación de 0,76.

Fig. 5 Análisis estructural parcial de los N-glicanos diferencialmente regulados.

Las tres columnas en esta figura representan los resultados de la secuenciación en matrices de exoglicosidasa sobre los N-glicanos derivados de las glicoproteínas en tres muestras de suero. Estas muestras se eligieron para reflejar el intervalo cuantitativo de las alteraciones observadas en este estudio. La columna de secuenciación más a la izquierda se obtuvo del análisis de una muestra con hepatitis crónica y es representativa de los perfiles de control. La columna central representa una alteración relativamente leve, entrando ya en los valores de corte para las tres variables de diagnóstico de la cirrosis descritos en el texto. La columna derecha resulta del análisis de una de las muestras más afectadas. Es muy útil comparar los picos descritos en el Ejemplo 9 con respecto a estas tres columnas, y la posibilidad de esta comparación simplifica enormemente el seguimiento de picos en todos los paneles de secuenciación de exoglicosidasa. Los picos representados en negro no llevan un residuo de GlcNAc bisecante. A este respecto, pueden todos considerarse derivados del oligosacárido central trimanosil-GlcNAc₂. Los picos representados en gris están todos modificados con un residuo de GlcNAc bisecante y así pueden todos considerarse derivados del oligosacárido central trimanosil-GlcNAc₂ sustituido con GlcNAc bisecante. Los paneles de referencia bajo las columnas de secuenciación en el centro y a la derecha se ensamblaron de diferentes electroferogramas, cada uno resultante de una digestión con exoglicosidasa específica sobre glicanos de referencia con estructura conocida. Los glicanos de referencia usados fueron: 1) trisialo, trigalacto triantenario; 2) bisialo, bigalacto biantenariano con fucosa ligada a núcleo-α-1,6 (panel de referencia bajo la columna central) y 3) asialo, bigalacto biantenariano con fucosa ligada a núcleo-α-1,6 y GlcNAc bisecante (panel de referencia bajo la columna más a la derecha).

Fig. 6 Distorsión de los datos para los 5 picos en los perfiles de N-glicoma en suero que muestran la

tendencia deseada: valores progresivamente elevados o reducidos con gravedad de la enfermedad del hígado creciente.

La agrupación es la misma que en la Figura 1. Estos picos se usaron adicionalmente para desarrollar las variables de diagnóstico descritas en el texto.

5 **Fig. 7 Estricta correlación lineal entre los parámetros de detección de cirrosis medidos por el método de preparación de muestras basado en la placa Immobilon-P y el nuevo método basado en el ciclador térmico**

10 Se analizaron 20 muestras de suero elegidas al azar del grupo de enfermedad del hígado crónica y del grupo de control sano usando ambos métodos de preparación de muestras. Los tres parámetros de diagnóstico Log (Pico 1/Pico 8), Log (Pico 2/Pico 8) y Log (Pico 7/Pico 8) muestran una correlación lineal casi perfecta entre los dos métodos (r de Pearson $\geq 0,98$). Esto muestra que la validez de los resultados de diagnóstico se conserva independientemente del método de preparación de muestras.

15 **Fig. 8 Análisis del perfil de N-glicanos en proteínas totales en suero en ABI310.**

20 Las dos muestras de cirrosis de la Figura 5 se re-analizaron usando el analizador de ADN ABI310 basado en electroforesis capilar. Como puede observarse de una comparación del electroferograma del hidrolizado de dextrano en esta figura y en la Figura 5, el análisis en ABI310 tiene una resolución significativamente mejor que en geles de ABI377. El comportamiento de migración relativo de los N-glicanos es algo diferentes entre ambos métodos, supuestamente debido a que el método capilar usa una poliacrilamida lineal como matriz de separación en lugar de un gel de poliacrilamida reticulado.

Fig. 9 Marcador de fibrosis derivado del perfil de N-glicanos sialilados de glicoproteínas totales en suero.

25 Se cuantificó la altura de los picos de los 7 picos principales bien resueltos presentes en todos los perfiles de N-glicanos en estudio y se normalizó a la abundancia total de picos cuantificados en cada perfil. El Pico 1 y el Pico 5 se correlacionaron lo mejor posible con las etapas de fibrosis de HAI (evaluado por la prueba de correlación por rangos de Spearman, $\rho = -0,696$ y $0,762$, resp.). Los intervalos de confianza del 95 % se muestran en los Paneles A, resp. B. Además, las alturas de los picos del Pico 1 y Pico 5 se correlacionan bien entre sí (r de Pearson = $-0,827$). Por consiguiente, los presentes inventores calcularon la relación entre ambos picos y transformaron logarítmicamente este valor para normalizar las distribuciones. Esto hace la prueba más simple, ya que solo necesitan cuantificarse dos picos en lugar del perfil completo. Los intervalos de confianza del 95 % para el logaritmo del parámetro derivado (sia 5 a sia 1) se muestran en el Panel C. Este parámetro se correlaciona bien con las etapas de fibrosis de HAI (ρ de Spearman = $0,765$). Sia 5 y sia 1 se refieren a los picos 1 y 5 de glicanos sialilados. El pico 5 en el perfil sialilado tiene la misma estructura que en el pico 1 del perfil desialilado (véase el Ejemplo 9). El pico 1 en el perfil sialilado tiene la misma estructura que el pico 3 en el perfil desialilado (véase el Ejemplo 9). Obsérvese que las estructuras sialiladas tienen dos ácidos alfa-2,6-N-acetilneuramínicos adicionales cuando se comparan con estructuras desialiladas.

Objetivos y descripción detallada

40 Actualmente, las pruebas diagnósticas de pacientes en la primera presentación con un trastorno crónico del hígado demandan una biopsia del hígado para evaluar la etapa de fibrosis y actividad, y para detectar la aparición de cirrosis temprana¹⁰. Sin embargo, en un gran subgrupo de los pacientes con enfermedad crónica del hígado (principalmente hepatitis viral crónica, trastornos del hígado genéticamente causados o relacionados con el alcoholismo), la fibrosis progresa con tasas variables hacia la cirrosis, un desarrollo que finalmente conduce a complicaciones graves¹¹ y mortalidad significativa y que es un factor de riesgo importante para el desarrollo de carcinoma hepatocelular¹² (CHC). Como la biopsia del hígado es un procedimiento con molestia significativa al paciente y con algún riesgo de complicaciones¹³, no es adecuada para ser incorporada en el seguimiento rutinario (generalmente anual) de pacientes con enfermedad crónica del hígado. Por tanto, existe una demanda clínica de marcadores que puedan evaluar rutinariamente la progresión de la fibrosis hepática, y puedan detectar fiablemente la etapa de cirrosis hepática temprana, que está asociada a la morbilidad más significativa. En la presente invención, los presentes inventores cumplen esta necesidad y los presentes inventores han desarrollado una plataforma de tecnología para una aplicación de glicómica clínica en la detección de fibrosis hepática y una detección en el cambio de la progresión de la fibrosis hepática en un paciente previamente diagnosticado con fibrosis hepática. Los presentes inventores han perfilado cuantitativamente las estructuras de hidratos de carbono derivadas de las glicoproteínas presentes en suero y han identificado correlaciones estadísticamente relevantes entre parámetros cuantitativos derivados de estos parámetros y la etapa de la fibrosis hepática histológica de los pacientes en estudio. En otras palabras, se han identificado sorprendentemente en la presente invención cantidades de hidratos de carbono de diagnóstico o cantidades relativas entre dichos hidratos de carbono que se correlacionan con la gravedad de la fibrosis hepática.

60 En el presente documento se desvela un método para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero, que comprende (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos presentes en una mezcla de glicoconjugados u obtenidos de una mezcla de

glicoconjugados que están presentes en o se aíslan de una muestra de un líquido corporal de dicho mamífero, y (b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono, y (c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de detectar fibrosis hepática o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de detectar un cambio en la progresión de la fibrosis hepática y (d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero.

La expresión 'un método para detectar fibrosis hepática' puede entenderse ampliamente como un método para cribar, un método para diagnosticar o un método para pronosticar (o monitorizar) fibrosis hepática. La expresión 'un cambio en la progresión de la fibrosis hepática' se refiere a la evolución de la fibrosis hepática con el tiempo que puede significar una mejora de la etapa de cirrosis hepática (por ejemplo, de la etapa 3 de Metavir a la etapa 2 de Metavir) o una estabilización de la etapa de fibrosis hepática o un empeoramiento de la etapa de fibrosis hepática. Un método para detectar una progresión de la fibrosis hepática es, en otras palabras, un instrumento de monitorización que puede usarse para pronosticar un paciente (o población de pacientes) previamente diagnosticado con fibrosis hepática. En la expresión 'atribuir los resultados de la comparación' se refiere a las diferentes formas de resultados que pueden obtenerse. 'Resultados' puede comprender un aumento en un valor, una disminución en un valor, una estabilidad en un valor. Alternativamente, 'resultados' puede entrar dentro de un intervalo de valores (por ejemplo, intervalo de confianza del 95 %, una desviación estándar) obtenida de, por ejemplo, un análisis de grupos de pacientes con una etapa específica histológicamente confirmada de fibrosis. En la presente invención, la etapa 4 de Metavir (IV) se refiere a cirrosis temprana o fibrosis de etapa tardía que significa la expresión cirrosis temprana o fibrosis de etapa tardía o equivalente. También la expresión "pre-cirrótica" se refiere aquí a las etapas fibróticas 1, o 2, o 3. También se describe que un perfil de hidratos de carbono puede usarse para la fabricación de un ensayo de diagnóstico para la detección de fibrosis hepática, dicho ensayo de diagnóstico comprende las siguientes etapas: (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos presentes en una mezcla de glicoconjugados u obtenidos de una mezcla de glicoconjugados que están presentes en o se aíslan de una muestra de un líquido corporal de dicho mamífero, y (b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono, y (c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de detectar fibrosis hepática o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de detectar un cambio en la progresión de la fibrosis hepática y (d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero.

La expresión 'glicoconjugados que están presentes en' se refiere a hidratos de carbono que se detectan en los glicoconjugados sin ninguna etapa de aislamiento de dichos hidratos de carbono; así, la muestra se usa como tal y no implica ninguna etapa de aislamiento de los hidratos de carbono, mientras que la expresión 'se aíslan de una muestra de un líquido corporal' se refiere al hecho de que los hidratos de carbono se aíslan de los glicoconjugados presentes en la muestra.

En una primera realización, la invención proporciona un método para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica en un mamífero, que comprende:

- a) generar un perfil de N-glicomas del suero de hidratos de carbono ligados en N o fragmentos de oligosacáridos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos; estando dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos presentes en u obtenidos de las proteínas totales en suero que están presentes en o se aíslan de una muestra de suero sanguíneo de dicho mamífero, y
- b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono ligado en N o un fragmento de oligosacárido derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono ligado en N o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono ligado en N o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono ligados en N, y
- c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica y
- d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica.

El método de la invención puede usarse para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un mamífero que padece fibrosis hepática. También se muestra que el método de la invención detecta específicamente fibrosis hepática. El término 'específicamente' se refiere al hecho de que la fibrosis hepática puede diagnosticarse de forma diferente de otros trastornos hepáticos que comprenden cirrosis hepática temprana y cirrosis hepática de etapa tardía.

El término 'hidrato de carbono' puede entenderse como glicanos que están presentes en la estructura de glicoconjugados o que se derivan de glicoconjugados, comprendiendo las categorías de glicanos conocidas en la técnica como glicanos ligados a asparagina (también designados N-glicanos) o glicanos ligados a serina/treonina (también designados O-glicanos) de proteínas o glicosaminoglicanos o glicanos derivados de proteoglicanos, glicanos presentes en o derivados de glicolípidos e hidratos de carbono derivados de anclaje de GPI. En una realización preferida, los hidratos de carbono son N-glicanos. Las palabras "glicano" e "hidrato de carbono" son intercambiables. Un 'glicoconjugado' significa cualquier compuesto (por ejemplo, proteína o lípido) que contiene un resto de hidrato de carbono. Con la expresión 'una mezcla de glicoconjugados' se indica una composición que contiene al menos dos (al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más) de dichos glicoconjugados, que posiblemente también comprende materiales no glicoconjugados tales como proteínas, lípidos, sales y agua. La expresión 'hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos' significa que los hidratos de carbono pueden fragmentarse para dar al menos un oligosacárido o un derivado del mismo entre los productos del proceso de fragmentación. Otros productos de este proceso de fragmentación podrían incluir monosacáridos y oligosacáridos o derivados de los mismos. Un oligosacárido es un hidrato de carbono cuya estructura química consiste en al menos dos unidades químicamente ligadas conocidas en la técnica como monosacárido. Dicho proceso de fragmentación puede implicar tratamientos enzimáticos, químicos y físicos. Por ejemplo, los hidratos de carbono pueden tratarse (o digerirse) con una enzima glicosidasa (por ejemplo, una sialidasa para eliminar los residuos de ácido siálico de los hidratos de carbono, o una fucosidasa para eliminar los residuos de fucosa de los hidratos de carbono) y, por tanto, el perfil obtenido consiste en fragmentos de los hidratos de carbono. Las digestiones con glicosidasa pueden, por ejemplo, llevarse a cabo para obtener un perfil más simple de los hidratos de carbono. Los ácidos siálicos también pueden eliminarse de una forma química por hidrólisis ácida suave de los hidratos de carbono. En métodos de análisis de espectrometría de masas, la palabra 'fragmentos' se refiere al hecho de que los hidratos de carbono se fragmentan muy frecuentemente en el proceso de análisis (por ejemplo, en disociación inducida por colisión), en cuyo caso los productos de fragmentación también pueden dar un derivado de oligosacárido constituido de un oligosacárido químicamente ligado al resto de uno o más monosacáridos que fueron parte de la estructura del hidrato de carbono antes de que tuviera lugar la fragmentación. Un ejemplo de un derivado de oligosacárido tal que es el producto de un proceso de fragmentación por espectrometría de masas se conoce en la técnica como un ión de producto de escisión de anillo cruzado. Una 'característica de dicho hidrato de carbono' se refiere a cualquier parámetro medible del mismo cuyas propiedades y/o la cantidad se determinan por la estructura del hidrato de carbono. Ejemplos de tales parámetros medibles son, por ejemplo, parámetros de resonancia magnética nuclear tales como desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento homonuclear y heteronuclear, efectos Overhauser nuclear y acoplamientos dipolares residuales. Alternativamente, tales parámetros medibles podrían ser el grado de unión de dicho hidrato de carbono a otras moléculas tales como lectinas y anticuerpos que reconocen determinantes estructurales específicos o combinaciones de los mismos en el hidrato de carbono. Todavía otro de tales parámetros medibles podría ser el grado de la capacidad del hidrato de carbono para funcionar de sustrato para una enzima que modifica específicamente ciertos hidratos de carbono tales como glicosiltransferasas y glicosidasas.

La expresión 'estando dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos presentes en una mezcla de glicoconjugados u obtenidos de una mezcla de glicoconjugados' se refiere al hecho de que un 'perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono' puede tanto obtenerse de hidratos de carbono que están todavía químicamente ligados a los glicoconjugados en la mezcla como de hidratos de carbono que se han liberado (aislado) de los glicoconjugados por medios enzimáticos, químicos o físicos. En una realización preferida, los N-glicanos se liberan de las glicoproteínas en la mezcla por digestión enzimática con péptido N-glicosidasa F u otras endoglicosidasas conocidas en la técnica. En otra realización, N- y O-glicanos pueden liberarse usando un procedimiento que implica hidracina, conocido para aquellos expertos en la materia. En otra realización más, los O-glicanos pueden liberarse selectivamente usando eliminación beta en condiciones alcalinas según procedimientos muy conocidos. En caso de que el perfil se obtenga sobre hidratos de carbono que están todavía químicamente ligados a los glicoconjugados en la mezcla, una realización implica el uso de enzimas o procedimientos químicos para modificar la parte de no-glicano del glicoconjugado antes de obtener el perfil, tal como proteasas o enzimas que modifican la parte de lípidos de glicolípidos. La expresión 'un perfil de hidratos de carbono' significa cualquier entidad que comprende información cualitativa y/o cuantitativa sobre dichos hidratos de carbono. Por ejemplo, esto puede significar un perfil electroforético o cromatográfico de dichos hidratos de carbono. En un caso particular, el perfil es un espectro de masas de dichos hidratos de carbono. Alternativamente, el perfil puede ser información obtenida por análisis de resonancia magnética nuclear. En otro ejemplo más, el perfil puede ser información que describe aspectos cualitativos o cuantitativos de lectina que se une a los hidratos de carbono. Alternativamente, el perfil puede ser información que describe el grado al que los hidratos de carbono son sustratos para enzimas específicas tales como glicosiltransferasas o glicosidasas. Tal información puede incluir lecturas de

mediciones de subproductos de tales reacciones enzimáticas, tales como nucleótidos liberados en cantidades equimolares en reacciones de glicosiltransferasa. En una realización particular, la expresión 'generar un perfil de hidratos de carbono' o 'perfilado de hidratos de carbono' también puede implicar que las estructuras de glicano se separan y posteriormente se detectan. Normalmente se identifican varios hidratos de carbono en un perfil de hidratos de carbono. Normalmente, los hidratos de carbono están presentes en una mezcla compleja y la separación es necesaria para una detección eficaz. La separación puede llevarse a cabo con métodos que comprenden métodos electroforéticos y cromatográficos. La detección puede llevarse a cabo con métodos que comprenden detección de anticuerpos, detección de lectina, RMN, espectrometría de masas y fluorescencia. En una realización particular es necesario eliminar químicamente y/o enzimáticamente los glicanos de las glicoproteínas antes de que los glicanos puedan ser perfilados. Métodos para preparar glicanos a partir de glicoproteínas son muy conocidos en la técnica. En otra realización particular es necesario derivatizar los glicanos antes de la separación y la detección. En un enfoque, el método de la presente invención para el perfilado (incluye separación y detección) de glicanos puede llevarse a cabo en combinación con una secuenciación de ADN. Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que este método también puede aplicarse a propósito de sistemas de electroforesis capilar adaptables a un detector de fluorescencia inducido por láser. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, los sistemas de electroforesis capilar serie P/ACE (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.). La invención también puede aplicarse con cualquier sistema de electroforesis que sea adaptable con un detector de fluorescencia inducido por láser. En otra realización también pueden usarse métodos de detección de espectrometría de masas tales como EM MALDI-TOF para la medición de la cantidad de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo. En los métodos de espectrometría de masas, los hidratos de carbono se fragmentan muy frecuentemente y, por tanto, en dichos métodos los fragmentos de hidratos de carbono se detectan.

En otra realización más el perfilado puede llevarse a cabo con un método de microfluídica. La microfluídica es un campo que está creciendo rápidamente y se basa en la migración de fluidos a través de canales de perforación estrecha creados en un medio sólido (principalmente obleas de sílice o placas de vidrio de alta pureza) mediante técnicas tomadas prestadas de la industria de los microchips (fotolitografía y decapado húmedo químico). Los fluidos pueden migrar a través de estos canales mediante acción capilar o bombardeo activo, y los analitos pueden migrar en canales llenos de fluido mediante electroforesis (Schmalzing et al. (2001) *Methods Mol. Biol.* 163, 163-173). En otra realización más, la separación de hidratos de carbono puede llevarse a cabo mediante una separación cromatográfica con métodos que incluyen cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de gases.

El término 'al menos un hidrato de carbono' se refiere a la medición de la cantidad de al menos un hidrato de carbono presente en el perfil de hidratos de carbono que es diagnósticamente relevante para la detección de fibrosis hepática (dicho al menos un hidrato de carbono puede, por tanto, designarse al menos un hidrato de carbono de diagnóstico). En una realización, la medición de un hidrato de carbono es suficiente para diagnosticar fibrosis hepática. Esto significa que en un caso particular un hidrato de carbono está presente en un mamífero que padece fibrosis y está ausente en un mamífero libre de fibrosis, en otro caso particular un hidrato de carbono está presente en un mamífero libre de fibrosis y ausente en un mamífero que padece fibrosis. En otro ejemplo particular, una cantidad diferente de un hidrato de carbono es suficiente para diferenciar entre un mamífero que padece fibrosis y un mamífero libre de fibrosis. En una realización preferida se mide la cantidad de uno, dos o incluso más hidratos de carbono (de diagnóstico). En un método de perfilado, la cantidad del hidrato de carbono (de diagnóstico) puede medirse, por ejemplo, calculando la altura del pico o la superficie del pico. Comparando la cantidad de al menos un hidrato de carbono (de diagnóstico), presente en muestras de paciente, con niveles de hidratos de carbono de diagnóstico correspondientes presentes en un individuo libre de fibrosis hepática, puede diagnosticarse la presencia o ausencia de la fibrosis hepática. La invención puede usarse sobre muestras obtenidas de mamíferos tales como seres humanos. Los hidratos de carbono de diagnóstico pueden ser oligosacáridos, o polisacáridos. Los hidratos de carbono de diagnóstico pueden estar ramificados o sin ramificar. Los hidratos de carbono de diagnóstico en una muestra de un individuo afectado con fibrosis hepática están presentes con una abundancia (cantidad) que es tanto coherentemente mayor como coherentemente menor que en una muestra de un individuo sin afectar (que no tiene fibrosis hepática).

El término "derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos" se refiere a hidratos de carbono que se han marcado con un agente que conduce a una detección eficaz de los hidratos de carbono. Dichos hidratos de carbono marcados también se llaman hidratos de carbono derivatizados. Como un ejemplo, puede usarse un compuesto fluorescente para el marcado de los hidratos de carbono. Dichos compuestos fluorescentes también están preferencialmente cargados de forma que los compuestos derivatizados puedan migrar bajo condiciones electroforéticas. Cuando la marca de fluoróforo está sin cargar, puede acoplarse a una especie que confiere carga. Dicha marca de fluoróforo también permite la medición cuantitativa de los hidratos de carbono derivatizados por fluorescencia. Compuestos que fluorescen tales como ácido 9-aminopireno-1,4,6-trisulfónico (APTS) y ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS) son particularmente adecuados para la separación electroforética de hidratos de carbono derivatizados. Otros compuestos para el marcado fluorescente de hidratos de carbono incluyen 2-aminopiridina (AP), 5-aminonaftaleno-2-sulfonato (ANA), ácido 1-amino-4-naftalenosulfónico (ANSA), ácido 1-amino-6,8-disulfónico (ANDA), 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolinacarboxaldehído (CBQCA), amarillo lucifer, 2-aminoacridona y 4-aminobenzonitrilo (ABN).

En una realización particular, con respecto a la detección de los hidratos de carbono fluorescentemente marcados, puede aplicarse cualquier método de detección conocido en la técnica, pero preferentemente la detección se lleva a cabo con un láser tal como un láser de diodo, un láser de He/Cd o un láser de ión argón. En una realización particular, el perfil de las bandas de hidratos de carbono marcados producidas por la separación electroforética se visualiza usando un sistema de obtención de imágenes basado en una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD). La información de la cámara CCD puede almacenarse posteriormente en forma digital y analizarse por diversos programas informáticos para comparar patrones de hidratos de carbono de diagnóstico entre individuos y entre patrones de referencia. En otra realización particular, los hidratos de carbono de diagnóstico separados en gel pueden transferirse a una membrana de inmovilización, es decir, transferirse y a continuación sondarse con diversos reactivos específicos de hidratos de carbono de diagnóstico tales como lectinas o anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para dichos hidratos de carbono de diagnóstico. También se describe un método para detectar fibrosis hepática en un mamífero que comprende medir y detectar al menos una estructura de glicano y/o glicoconjugado que tiene una abundancia diferente en muestras derivadas de individuos con y sin fibrosis usando ligandos que se unen específicamente a dicha al menos una estructura de glicano y/o glicoconjugado. Los ligandos comprenden lectinas y anticuerpos. Por ejemplo, la elevada abundancia de las estructuras de N-glicano (o sus conjugados) con un residuo de 'GlcNAc bisecante' (producto GnT-III) en una muestra de líquido corporal puede detectarse con una lectina que reconoce específicamente glicanos (o sus conjugados) que se modifican con un GlcNAc bisecante, tal como la lectina eritro-aglutinante de *Phaseolus vulgaris* (E-PHA) o mutantes de la misma con, por ejemplo, especificidad mejorada, o anticuerpos específicos para glicanos así modificados. Alternativamente, la elevada abundancia de las estructuras de N-glicano con un residuo de 'GlcNAc bisecante' (o sus conjugados) puede detectarse por una reducción en la unión a los N-glicanos (o sus conjugados) a lectinas que solo se unen a N-glicanos (o sus conjugados) si no están sustituidos con un residuo de GlcNAc bisecante. Un ejemplo de una lectina tal es la lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A). La galactosilación por defecto observada de los N-glicanos de la glicoproteína del suero puede detectarse por una lectina de unión a GlcNAc terminal tal como la lectina de *Griffonia simplicifolia* II (GS-II). Alternativamente, la galactosilación por defecto puede medirse por una reducción en la unión de una lectina que se une a galactosa terminal tal como la lectina de *Erythrina crystagalli*.

En una realización particular, el 'perfil de una característica determinada por la estructura de los hidratos de carbono' se obtiene midiendo la propiedad de los hidratos de carbono que está constituida por ser un sustrato para una glicosiltransferasa específica. En una realización preferida, esta glicosiltransferasa es beta-1,4-galactosiltransferasa y los hidratos de carbono son aquellos presentes en la mezcla total de proteínas séricas o plasmáticas. Un sustrato adicional para esta reacción es UDP-galactosa, y la reacción da UDP en una cantidad estequiométrica. Así, el perfil puede obtenerse midiendo la diferencia entre el grado de galactosilación de las proteínas desialiladas antes y después de la reacción, por ejemplo, por un método que implica la unión de las glicoproteínas a una lectina específica para beta-galactosa terminal (tal como las lectinas conocidas en la técnica derivadas de *Ricinus communis* y de *Erythrina crystagalli*, o las galectinas tales como la derivada de *Coprinus cinereus*). Alternativamente, el perfil puede obtenerse midiendo la cantidad de UDP generada en la reacción de beta-1,4-galactosiltransferasa en la mezcla de proteínas séricas o plasmáticas, por ejemplo, por HPLC. La cantidad de UDP también puede medirse usando una reacción enzimática acoplada a una o más enzimas conocidas del metabolismo de los nucleótidos, tales como, por ejemplo, una nucleótido difosfatasa tal como la GDPasa de Golgi de levadura, que también muestra actividad hidrolítica significativa hacia UDP. En este último caso, el perfil puede obtenerse midiendo tanto UMP como fosfato, usando técnicas muy conocidas. Todavía otro ejemplo de una medición de UDP implica el uso de poros de membrana supramoleculares con afinidad diferencial por UDP-Gal y UDP, como se conoce en la técnica. Los perfiles así obtenidos pueden, por ejemplo, normalizarse para la cantidad total de proteína o hidrato de carbono presente en la muestra de suero o de plasma. En otra realización más, el perfil puede obtenerse usando los hidratos de carbono presentes en la mezcla de proteínas séricas o plasmáticas como sustrato para tanto beta-1,4-galactosiltransferasa como una sialiltransferasa, con UDP-galactosa y ácido CMP-N-acetilneuramínico como sustratos donantes de azúcar. En esta realización, el perfil pueden tanto consistir en la diferencia en la unión de una lectina que se une a ácido siálico (tal como la lectina muy conocida en la técnica derivada de *Maackia amurensis* o *Sambucus nigra*) a las glicoproteínas antes y después de la reacción, como puede consistir en medir la cantidad de UDP y/o CMP liberada durante la reacción, usando métodos conocidos en la técnica.

En otra realización, el método de perfilado de hidratos de carbono puede complementarse pre-electroforéticamente con uno o más patrones internos marcados con un cromóforo o fluoróforo diferente de la marca unida a los analitos de hidrato de carbono. El patrón interno permite la determinación precisa y reproducible de las movilidades electroforéticas del hidrato de carbono derivatizado referenciando estas movilidades a las movilidades de los componentes en la mezcla de patrón interno. Por ejemplo, puede añadirse un patrón de oligonucleótido marcado con rodamina Genescan™ 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) o una mezcla de oligonucleótidos 6-, 18-, 30- y 42-méricos marcados con rodamina a los glicanos derivatizados antes del perfilado. Pueden marcarse patrones de diagnóstico antes del marcado de las muestras para el análisis; sin embargo, los patrones de diagnóstico se marcan preferentemente concomitantemente con el marcado de los patrones para el análisis. Además, los hidratos de carbono de diagnóstico en los patrones se cuantifican preferentemente de manera que se proporcionen comparaciones cuantitativas o cualitativas con la cantidad de hidratos de carbono de diagnóstico en las muestras para análisis.

El término 'líquido corporal' incluye sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, saliva, orina, líquido de la médula

ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido linfático, líquido amniótico, líquido de aspiración del pezón y similares. Líquidos corporales preferidos para el análisis son aquellos que se obtienen convenientemente de pacientes, particularmente líquidos corporales preferidos incluyen suero sanguíneo y plasma sanguíneo.

5 Aunque la presente invención puede llevarse a cabo sin pre-tratamiento de la muestra antes del perfilado de los glicanos (derivatizados), en una realización particular, las muestras para análisis pueden requerir procesamiento antes de la separación y cuantificación de los hidratos de carbono de diagnóstico. El método preciso de procesamiento de muestras empleado puede variar según varios factores atribuibles a la elección del líquido de muestra y la identidad de los hidratos de carbono de diagnóstico; estos factores incluyen: la abundancia del hidrato de carbono de diagnóstico, la concentración de hidratos de carbono de fondo, la presencia de moléculas interferentes, por ejemplo, moléculas que afectan adversamente la movilidad de la banda de hidratos de carbono de diagnóstico o el marcado fluorescente de los hidratos de carbono de diagnóstico, y si la marca fluorescente tiene que separarse de los hidratos de carbono de diagnóstico derivatizados. Métodos adecuados para este procesamiento o pre-tratamiento de muestras incluyen: diálisis, para eliminar moléculas interferentes (por ejemplo, sal para una detección eficaz por espectrometría de masas); ultrafiltración, para concentrar hidratos de carbono de diagnóstico y eliminar moléculas interferentes; centrifugación, para eliminar partículas interferentes o células concentradas; precipitación, para eliminar moléculas interferentes, eliminación de albúmina del suero para enriquecer en proteínas glicosiladas y de ahí para reducir la abundancia de glicanos, desglicosilación con una glicosidasa (por ejemplo, un digesto de sialidasa de los glicanos) para generar un perfil de glicanos más simple; cromatografía tal como cromatografía de afinidad para eliminar, por ejemplo, albúmina del suero

También se desvela en el presente documento un método para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero, comprendiendo dicho método (a) generar un perfil de hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono; estando dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos presentes en una mezcla de glicoconjugados u obtenidos de una mezcla de glicoconjugados que están presentes en o se derivan de una muestra de un líquido corporal de dicho mamífero y (b) medir la cantidad relativa de al menos un hidrato de carbono o un fragmento derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono o dicho fragmento, presente en dicho perfil de hidratos de carbono y (c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de detectar fibrosis hepática o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de detectar un cambio en la progresión de la fibrosis hepática y (d) atribuir los resultados de la medición en la etapa c) para detectar cirrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero. El término 'medir la cantidad relativa' se refiere al aspecto de que la cantidad de al menos un hidrato de carbono o fragmento (por ejemplo, un hidrato de carbono particular o fragmento) puede medirse entre dos perfiles, un perfil que se deriva de un mamífero libre de fibrosis hepática y otro perfil derivado de un mamífero que posiblemente padece fibrosis hepática y que va a diagnosticarse para fibrosis hepática. Alternativamente, la cantidad de un hidrato de carbono particular puede compararse entre un intervalo de referencia promedio tomado de mamíferos libres de fibrosis hepática y la cantidad medida de dicho hidrato de carbono particular en un mamífero que va a diagnosticarse para fibrosis hepática. En otra realización más, 'medir la cantidad relativa' se refiere a medir la cantidad relativa de al menos dos hidratos de carbono o fragmentos derivados de los mismos o derivados marcados de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono o dichos fragmentos de hidratos de carbono presentes en un perfil de hidratos de carbono derivado de una muestra de un líquido corporal de un animal.

También se describe que, con el fin de ser capaz de medir cantidades relativas de los hidratos de carbono, se incluyen patrones de diagnóstico en los geles usados para analizar los hidratos de carbono de diagnóstico en las muestras de sujetos; sin embargo, la información integrada por el patrón de diagnóstico, por ejemplo, distancia de migración de la banda e intensidad, también puede obtenerse de la comparación con registros guardados hechos de patrones de diagnóstico previamente sometidos a electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo en condiciones similares a las condiciones a las que se exponen las muestras para análisis. Los patrones de diagnóstico pueden ser tanto positivos, es decir, correspondientes al patrón de hidrato de carbono completo en un individuo afectado, como negativos, es decir, correspondientes al individuo sin afectar. Los patrones de diagnóstico pueden tener una composición similar a la de las muestras para análisis porque pueden contener tanto hidratos de carbono de diagnóstico como hidratos de carbono de fondo con composición similar a la encontrada en muestras reales. Los patrones de diagnóstico pueden derivarse de muestras obtenidas de individuos afectados y no afectados. Alternativamente, los patrones de diagnóstico pueden contener uno o más hidratos de carbono de diagnóstico libres de hidratos de carbono de fondo.

En una realización particular, la técnica de diagnóstico para medir la fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática no requiere un conocimiento detallado a priori de la estructura de los hidratos de carbono.

Así, en otra realización, la invención proporciona un método para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica en un mamífero, que comprende:

a) generar un perfil de N-glicomas del suero de hidratos de carbono ligados en N o fragmentos de oligosacáridos

derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos; estando dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos presentes en u obtenidos de las proteínas totales en suero que están presentes en o se aíslan de una muestra de suero sanguíneo de dicho mamífero, y

b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono ligado en N o un fragmento de oligosacárido derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono ligado en N o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono ligado en N o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono ligados en N, y

c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica y

d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica, en el que dicho al menos un hidrato de carbono ligado en N está seleccionado del grupo que consiste en:

- i) GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc (glicano 1),
- ii) GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,4)][GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc (glicano 2),
- iii) Gal(β-1,4)GlcNAc(α-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,4)][Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc (glicano 7),
- iv) Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)[Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)]Man(α-1,3)[Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)GlcNAc (glicano 8),
- v) un fragmento derivado del glicano 1, 2, 7 u 8,
- vi) un derivado sialilado del glicano 1, 2, 7 u 8,
- vii) una característica del glicano 1, 2, 7 u 8 o derivado o fragmento del mismo.

Por claridad, las estructuras de los picos 1, 2, 7 y 8 se corresponden con el perfil de hidratos de carbono representado en la Figura 1 y con la representación gráfica de estas estructuras en la Figura 5. Dicho perfil de hidratos de carbono es un perfil desialilado (sin ácido siálico en los glicanos), que significa que las estructuras de los picos 1, 2, 7 y 8 son estrictamente hablando fragmentos de hidratos de carbono (faltando las estructuras de ácido siálico). Los hidratos de carbono se presentan en el presente documento con las reglas de la IUPAC para la nomenclatura (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/38.html>), los picos según la Figura 1 se han identificado en la presente invención y se representan por su nomenclatura condensada y ampliada. En las reivindicaciones se usa la nomenclatura condensada. El nombre de las cuatro estructuras se resume aquí a continuación.

Estructura de glicano desialilado del pico 1 de la Figura 1:

Nomenclatura condensada:

GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc

Nomenclatura ampliada:

β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→3)-[β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Manp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-[α-L-Fucp-(1→6)]-D-GlcpNAc

Estructura de glicano desialilado del pico 2 de la Figura 1:

Nomenclatura condensada:

GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,4)][GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc

Nomenclatura ampliada:

β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→3)[β-D-GlcpNAc-(1→4)][β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Manp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-[α-L-Fucp-(1→6)]-D-GlcpNAc

Estructura de glicano desialilado del pico 7 de la Figura 1:

Nomenclatura condensada:

Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,3)[GlcNAc(β-1,4)][Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)[Fuc(α-1,6)]GlcNAc

Nomenclatura ampliada:

β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→3)-[α-D-GlcpNAc-(1→4)][β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Manp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-[α-L-Fucp-(1→6)]-D-GlcpNAc

Estructura de glicano desialilado del pico 8 de la Figura 1:

Nomenclatura condensada:

Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)[Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)]Man(α-1,3)[Gal(β-1,4)GlcNAc(β-1,2)Man(α-1,6)]Man(β-1,4)GlcNAc(β-1,4)GlcNAc

Nomenclatura ampliada:

β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→2)-[β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)]-α-D-Manp-(1→3)-[β-D-Galp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→2)-α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Manp-(1→4)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-D-GlcpNAc

En otra realización más, la invención proporciona un método para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica en un mamífero, que comprende:

- 5 a) generar un perfil de N-glicomas del suero de hidratos de carbono ligados en N o fragmentos de oligosacáridos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos; estando dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos presentes en u obtenidos de las proteínas totales en suero que están presentes en o se aíslan de una muestra de suero sanguíneo de dicho mamífero, y
- 10 b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono ligado en N o un fragmento de oligosacárido derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono ligado en N o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono ligado en N o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono ligados en N, y
- 15 c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica y
- 20 d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica,

en el que dicha cantidad se mide como una cantidad relativa entre el glicano 1 y el glicano 8 y/o el glicano 2 y el glicano 8 y/o el glicano 7 y el glicano 8 o un fragmento de oligosacárido, derivado sialilado o característica del mismo. En una realización particular del método descrito anteriormente, la cantidad relativa entre el glicano 2 y el glicano 8 o un fragmento de oligosacárido, derivado sialilado o característica del mismo, se usa para medir un cambio lineal en la progresión de la fibrosis hepática.

También se describe en el presente documento un kit de diagnóstico para realizar el diagnóstico de fibrosis hepática o para detectar un cambio en la progresión de la fibrosis hepática. Por ejemplo, puede prepararse un kit de diagnóstico para realizar el diagnóstico por electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo de fibrosis hepática. Como otro ejemplo, puede prepararse un kit de diagnóstico para realizar el diagnóstico por espectrometría de masas de fibrosis hepática. Los kits de diagnóstico por electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo proporcionan conjuntos de reactivos requeridos para realizar el diagnóstico de fibrosis hepática. Kits adecuados permiten a los laboratorios realizar convenientemente el diagnóstico por electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo. Los kits pueden incluir reactivos para realizar pruebas para identificar fibrosis hepática. Los kits pueden incluir patrones de diagnóstico, marca fluorescente, materiales de transferencia y de unión, por ejemplo, membranas, reactivos específicos de unión a hidratos de carbono, lectinas, instrucciones, recipientes de muestra y reactivos de gel de poli(acrilamida), geles precolados, tampones de enzima, agentes reductores (para su uso en el marcado con fluoróforo de hidratos de carbono) y enzimas glicosidasas (por ejemplo, sialidasa, galactosidasa, fucosidasa) que pueden catalizar reacciones que alteran estructuralmente los hidratos de carbono de diagnóstico. Kits más completos pueden incluir equipo para realizar la electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo, tales como aparato de gel de poli(acrilamida), CCD, láser, secuenciador de ADN, ordenadores, software y similares. Reactivos incluidos en los kits de diagnóstico por electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo se proporcionan preferentemente en cantidades previamente medidas. Los kits incluyen preferentemente las instrucciones para llevar a cabo el método de electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo desvelado en el presente documento.

La prueba de diagnóstico es útil en la práctica debido a que es suficientemente fácil de aplicar a gran escala por personal de laboratorio normalmente cualificado. Además, como los analizadores de alta resolución y de alta sensibilidad basados en electroforesis para la secuenciación de ADN y la detección de mutaciones ya están presentes en un número cada vez mayor de laboratorios clínicos o son asequibles para la mayoría de los laboratorios clínicos, la novedosa prueba de glicómica de diagnóstico para la fibrosis hepática puede realizarse en ellos. Además, la gama disponible de analizadores de ADN permite aumentar fácilmente de escala el rendimiento de la muestra desde solo algunas hasta cientos de muestras por día por máquina, dependiendo de la demanda de cada laboratorio. Este equipo de análisis de ADN ofrece la ventaja añadida de la automatización, reduciendo de la complejidad del proceso analítico global. El perfilado en la mezcla total de glicoproteínas aumenta la tolerancia de la prueba para pequeñas variaciones inter-individuales de la abundancia y el patrón de glicosilación de cada glicoproteína individual en la mezcla y así permite una prueba más robusta que los enfoques clásicos actuales en los que la glicosilación se estudia sobre glicoproteínas purificadas.

El método para la detección de la fibrosis hepática puede comprender además parámetros de bioquímica clínica y/o datos histológicos. Así, el método también puede llevarse a cabo convenientemente en combinación con parámetros de bioquímica clínica y/o histología y/o parámetros de obtención de imágenes. La medición de los parámetros de bioquímica clínica comprende la medición de niveles de bilirrubina y/o albúmina y/o tiempo de protrombina y/o proteína C reactiva y/o abundancia de IgA y/o concentración de ácido hialurónico en suero y/o aminotransferasas y/o varias pruebas del metabolismo del hígado conocidas en la técnica. En una realización específica se calcula el modelo de regresión logística binario fibrotest como se describe en el documento WO0216949 y se usa en

combinación con la prueba de diagnóstico de la presente invención.

En una realización del método para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica en un mamífero como se ha descrito anteriormente en este documento, el método comprende además la medición de evaluaciones cuantitativas o cualitativas de la condición física del mamífero, tal como los parámetros de bioquímica clínica. En una realización particular del método, dicha medición de los parámetros de bioquímica clínica comprende medir niveles de α 2-macroglobulina, haptoglobulina, GGT, bilirrubina, apolipoproteína A1 y determinar la edad y sexo y calcular una puntuación para el modelo de regresión logística binario fibrotest.

La histología comprende biopsias de hígado. La obtención de imágenes comprende ultrasonidos y/o TAC y/o IRM y/u obtención de imágenes de trazadores radiactivos específicos para el hígado.

Los ejemplos que siguen se ofrecen como descriptivos de ciertas realizaciones. Como tales, son a modo de ejemplo solo y no son de naturaleza limitante.

Ejemplos

1. Recogida de datos y procesamiento

Se obtuvo un perfil de N-glicanos desialilados (Fig. 1) para las 248 muestras de suero de los sujetos en estudio (véanse las muestras de suero y el diagnóstico clínico, Tabla 1), y los presentes inventores cuantificaron 14 picos que fueron detectables en todas las muestras. Su abundancia se normalizó a la intensidad de la altura de pico total de estos 14 picos. La cirrosis leve se define aquí como casos que tienen valores dentro del intervalo de referencia para los tres componentes bioquímicos del clasificador de cirrosis clásico de Child-Pugh (seroalbúmina, bilirrubina total y Relación Normalizada Internacional, la última es una medida de la velocidad de coagulación). Los presentes inventores definen los casos de cirrosis con valores fuera del intervalo de referencia para uno o más de estos tres marcadores como 'descompensada'. Así, el grupo de casos de 'cirrosis leve' es aquel que se clasificaría erróneamente como 'no cirrótico' por la presente evaluación bioquímica de cirrosis, y es obvio para este subgrupo que biomarcadores novedosos significan una mejora real. Los presentes inventores encontraron que 5 de los 14 picos en el N-glicoma del suero mostraron la tendencia deseada de tener una abundancia progresivamente mayor o menor en el orden: donantes de sangre sanos </> trastorno crónico del hígado no cirrótico </> cirrosis leve </> cirrosis descompensada, mientras que tienen una abundancia relativamente 'normal' para los grupos de control (Fig. 6). Estos aumentos en la abundancia de los Picos 1, 2 y 7 se correlacionan inversamente con las disminuciones en la abundancia de los Picos 3 y 8 (la r de Pearson varía de -0,5 a -0,8, para todos: $P < 0,0001$). Por tanto, los presentes inventores crearon tres variables nuevas (Fig. 2) cambiando de escala los Picos 1, 2 y 7 de abundancia elevada al Pico 8 de abundancia disminuida y posteriormente transformaron logarítmicamente estas nuevas variables para normalizar las distribuciones. De esta forma, los presentes inventores han resumido las tendencias de interés en los datos en tres variables, necesitando la cuantificación de solo 4 de los picos en el perfil de N-glicomas del suero (estos están recuadrados en la Figura 1; el tener también el Pico 3 en cuenta no añadió información de diagnóstico adicional tras una evaluación como se describe más adelante).

2. Detección de cirrosis

Para una de las tres nuevas variables [Log(Pico 7/Pico 8); en el presente documento se renombró GlycoCirrhoTest], la media del grupo de cirrosis leve (incluyendo aquellos casos de cirrosis leve complicados por carcinoma hepatocelular) fue significativamente diferente de la media de todos los otros grupos de muestras al nivel de significancia de 0,005 (ANOVA, HSD de Tukey). Las medias de las otras dos variables derivadas de glicoma del suero también fueron significativamente diferentes de la media de todos los otros grupos de muestras, pero a un menor nivel de significancia ($\alpha_{FW} = 0,05$). La capacidad de los tres glico-parámetros y de la {Fibrotest} para discriminar entre pacientes con cirrosis leve (como se ha definido anteriormente) y aquellos con enfermedad del hígado crónica pre-cirrótica se evaluó con el análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) no paramétrica^{16,17}. Los resultados del análisis de ROC indican eficiencias de clasificación como se miden por el área bajo la curva (ABC) del 85-90 % para tanto GlycoCirrhoTest como {Fibrotest} (Fig. 3a, arriba). Los otros dos parámetros derivados del glicoma del suero tuvieron una eficiencia de clasificación algo menor (ABC = $0,81 \pm 0,07$ para Log(Pico 1/Pico 8) y ABC = $0,81 \pm 0,06$ para Log(Pico 2/Pico 8); Fig. 3a, abajo). Los presentes inventores calcularon entonces los valores de corte de las curvas de ROC y usaron estos valores de corte para clasificar los pacientes mediante diagramas de dispersión bidimensionales (Fig. 3b, panel superior). La combinación de los dos biomarcadores que rindieron más aceptablemente para la detección de cirrosis en este estudio (la GlycoCirrhoTest basada en glicómica y el modelo de regresión logística binaria {Fibrotest}) da el 100 % de especificidad por la detección de cirrosis leve, con una sensibilidad del 75 % (18/24). La eficiencia global de la clasificación fue del 93 % (76/82). El grupo de aquellos pacientes con trastorno crónico del hígado con una descompensación en al menos uno de los marcadores bioquímicos clásicos para cirrosis (albúmina, bilirrubina, INR) también se clasificó usando los valores de corte anteriormente calculados (Fig. 3b, panel central), que revelaron el 100 % de sensibilidad para esta cirrosis avanzada.

Así, en el grupo de pacientes que fueron candidatos para la biopsia del hígado debido a un trastorno crónico del

hígado diagnosticado no hubo positivos falsos en la novedosa combinación de marcadores de los presentes inventores para la detección de cirrosis, y se detectaron casos de cirrosis bioquímicamente compensada con el 75 % sensibilidad, mientras que esto fue el 100 % para los casos bioquímicamente descompensados.

5 3. Comportamiento de las variables de diagnóstico en etapas de la fibrosis pre-cirrótica

La eficiencia de clasificación superior de GlycoCirrhoTest con respecto a los otros dos biomarcadores derivados del glicoma del suero se explica por las tendencias en los datos, cuando se representan según la etapa de fibrosis hepática histológicamente determinada¹⁸ (Figura 4). Mientras que Log(Pico 1/Pico 8) y especialmente Log(Pico 2/Pico 8) aumentan gradualmente al aumentar la etapa de la fibrosis, de F0/F1 en adelante, GlycoCirrhoTest permanece estable o incluso disminuye un poco de F0/F1 hasta F3, y solo aumenta en cirrosis. Es sorprendente que la correlación entre la etapa de fibrosis y los valores para Log(Pico 2/Pico 8) se aproxime a la linealidad ($p=0,76$ por correlación por rangos de Spearman), que lo hace un marcador muy prometedor para el seguimiento de la progresión de fibrosis (o ausencia de la misma). En cuanto al modelo {Fibrotest}, se observa un aumento sigmoidal de sus valores al aumentar la etapa de fibrosis, como era de esperar (los modelos de regresión logística binaria retroceden a un intervalo de 0-1, con comportamiento asintótico resultante en ambos extremos). En estudios previos¹⁴, se informó que la transición en la curva sigmoidal se encuentra en aproximadamente F2. En el estudio de los presentes inventores, los presentes inventores encuentran que la transición se encuentra en F3. No está claro cuál podría ser el motivo para esta diferencia.

4. Evaluación de GlycoCirrhoTest en otras enfermedades y en una muestra de población general

Para obtener un entendimiento más amplio de las características de la novedosa GlycoCirrhoTest, los presentes inventores clasificaron un grupo de control de donantes de sangre de la Cruz Roja (muestra de población general, negativos para VHB, VHC y VIH) optimizándose el valor de corte para la detección de cirrosis. Solo dos casos (de 60; 3 %) tuvieron puntuación levemente positiva (Fig. 3b, panel inferior). El consumo regular de alcohol no es criterio de exclusión para la donación de sangre (y el abuso de alcohol puede pasar desapercibido en este ámbito), y esta es la principal causa de cirrosis en regiones de baja incidencia del VHC tales como Flandes, Bélgica, donde se realizó el estudio. Combinado con la mediana de la edad bastante alta de este grupo (61 años), una tasa del 2-3 % de cirrosis compensada está dentro de la línea de esperanza¹⁹. Los presentes inventores incluyeron un grupo de control que consistió en 24 pacientes con enfermedades autoinmunitarias, debido a que la galactosilación por defecto de IgG del suero se ha documentado bien en la mayoría de estas enfermedades, especialmente en artritis reumatoide²⁰. Es obvio que las modificaciones de glicanos de IgG podrían reflejarse en el patrón de glicanos de las glicoproteínas totales en suero, ya que la IgG está presente a aproximadamente 11 g/l en suero y es la principal glicoproteína no producida en el hígado en este líquido. Así, los presentes inventores micropurificaron las inmunoglobulinas del suero de estos 24 pacientes y de 6 miembros del grupo de donantes de sangre sanos de los presentes inventores usando cromatografía de afinidad en proteína L, y se obtuvo un perfil de N-glicanos de estas preparaciones de inmunoglobulina purificadas. Como era de esperar, se detectó una galactosilación por defecto relativamente fuerte en el grupo autoinmunitario, principalmente reflejada en una elevada abundancia del glicano núcleo- α -1,6-fucosilado no galactosilado (estructura 1 en la Fig. 1, promedio 55 % superior a en los controles, $P=0,01$). Además, los presentes inventores encontraron un fuerte aumento en el nivel de sustitución de los N-glicanos de inmunoglobulina con un residuo de GlcNAc bisecante, reflejado en una duplicación en el promedio de la abundancia del glicano con estructura 7 de Fig. 1 ($P<0,0001$). Sin embargo, estos aumentos fueron en la mayoría de los casos insuficientes para alterar el patrón de N-glicano de glicoproteínas totales en suero tanto que tuviera una puntuación positiva en GlycoCirrhoTest (4/24 positivos). Los presentes inventores no pudieron evaluar Fibrotest en estos pacientes debido a suero disponible insuficiente. Para evaluar si la presencia de niveles elevados de transferrina deficiente en hidratos de carbono²¹ (CDT) en suero influyeron en los parámetros de diagnóstico de cirrosis de N-glicoma del suero, los presentes inventores obtuvieron muestras de suero de pacientes con alcoholismo crónico con y sin una CDT elevada. Las medias para los 3 parámetros de diagnóstico de cirrosis descritos anteriormente en el grupo positivo para CDT no fueron significativamente diferentes de las medias en el grupo con niveles normales de CDT ($P>0,1$, prueba de la t de Student) que muestra que diferencias en niveles de CDT no influyen en los marcadores de cirrosis de los presentes inventores.

5. Análisis estructural parcial de los N-glicanos diferencialmente abundantes

Los presentes inventores pudieron obtener información estructural significativa sobre los N-glicanos del suero diferencialmente regulados en cirrosis hepática, ayudados por la información en un informe de la bibliografía que describe un mapeo por HPLC tridimensional de los N-glicanos presentes en las glicoproteínas en suero humano 'sano'²². Además, de los estudios de diagnóstico de los presentes inventores, estuvieron disponibles muestras con un amplio intervalo cuantitativo en los picos de interés. Esto fue muy útil en el 'trazado' de los picos de interés mediante perfiles de matrices de post-exoglicosidasa. La secuenciación de la exoglicosidasa de tres de estas muestras se muestra en la Fig. 5. Una descripción completa del análisis estructural puede encontrarse en el Ejemplo 9. Las conclusiones resumidas de este análisis estructural son que hay una elevada abundancia de N-glicanos galactosilados por defecto (Picos 1 y 2) en cirrosis hepática, un aumento de N-glicanos modificados con un residuo de N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) (Picos 2 y 7) y una disminución de N-glicanos bi- y triantennarios completamente galactosilados (Picos 3 y 8).

6. Desarrollo de tecnología para la implementación en laboratorios de diagnóstico molecular rutinarios.

6.1 Preparación de muestras usando solo un ciclador térmico de PCR:

Habiendo obtenido la evidencia anterior de que el perfilado de N-glicomas del suero tiene utilidad diagnóstica, los presentes inventores introdujeron adicionalmente simplificaciones en su protocolo de preparación de muestras. Usando un ciclador térmico de PCR de tapa calentada estándar se desarrolló un procedimiento que solo implica la adición/eliminación de líquido y dilución para producir N-glicanos marcados listos para el análisis de suero en menos de 8 h, con poco tiempo de manipulación (véase la sección Métodos). La base del protocolo resultante es que la concentración de glicoproteína en suero es muy alta y que el método analítico de glicanos de los presentes inventores es muy sensible (15 fmoles fácilmente detectables). Por consiguiente, hay un amplio margen entre la cantidad de N-glicanos disponibles en una pequeña muestra de suero y la cantidad que se necesita analíticamente. Este amplio margen puede sacrificarse haciendo algunas etapas en el protocolo de preparación de muestras menos eficaces, pero fáciles de aplicar. Este protocolo se probó en 20 de las muestras de suero que se habían analizado antes con el método de preparación de muestras estándar de los presentes inventores. Los valores para las 3 variables de diagnóstico previamente descritas determinadas por ambas técnicas se correlacionaron linealmente muy fuertemente (la r de Pearson $\geq 0,98$; Fig. 7), demostrando que el novedoso método basado en el ciclador térmico puede sustituir el procedimiento de preparación de muestras más laborioso basado en placas Immobilon-P que los presentes inventores usaron antes. En la actual práctica de laboratorio de los presentes inventores, los presentes inventores han ensamblado todos los reactivos para este protocolo en una forma de kit que permite la preparación paralela de 48 ó 96 muestras.

6.2 Perfilado de electroforesis en gel capilar de N-glicomas del suero usando el analizador de ADN ABI 310

Los analizadores de ADN basados en electroforesis en gel capilar se usan generalizadamente en los laboratorios de patología molecular, en los que se usan para ensayos de diagnóstico que implican la secuenciación de ADN o análisis de fragmentos de ADN de alta resolución (análisis de tumores sólidos, diagnóstico de enfermedad infecciosa,...). Estos analizadores están sustituyendo rápidamente a los antiguos analizadores de ADN basados en gel debido a su nivel de automatización y facilidad de uso, que los hace más adecuados para la operación en laboratorios de diagnóstico clínico. Por tanto, para completar la implementación del ensayo de glicómica de los presentes inventores en el equipo estándar de laboratorios de patología molecular, los presentes inventores optimizaron el análisis del N-glicoma total en suero desialilado en el analizador de ADN de un solo capilar ABI 310. Solo se requirió poca modificación para que los procedimientos de análisis de ADN estándar obtuvieran el robusto perfilado en 18 min, con resolución incluso mayor que la obtenida en ABI 377 basado en gel (Fig. 8). Esto permite el análisis sin supervisión de 48 muestras de glicanos en suero marcadas con APTS en una ejecución durante la noche. En combinación con la preparación de muestras basada en el ciclador térmico, los presentes inventores lograron así un tiempo de entrega de 24 h para 48 muestras con no más intervención manual que la que se necesita para la reacción del análisis de fragmentos de ADN típica en un laboratorio de patología molecular. El rendimiento podría aumentarse fácilmente si fuera necesario, ya que están disponibles secuenciadores de múltiples capilares.

7. Muestras de suero y diagnóstico clínico

El grupo de estudio de pacientes con trastornos crónicos del hígado consiste en pacientes candidatos a biopsia del hígado enviados al Departamento de Gastroenterología y Hepatología del Hospital Universitario de Gante, independientemente de la etiología subyacente (viral, alcohólica, autoinmunitaria, criptogénica, véase más adelante). Se obtuvieron los siguientes datos: edad y sexo del paciente, seroalbúmina, bilirrubina total, INR, AST, ALT, GGT, proteína total en suero, α_2 -macroglobulina, haptoglobina y apolipoproteína A1. La seroalbúmina, bilirrubina total, AST, ALT, GGT y proteína total en suero se midieron en el analizador Modular (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La haptoglobina, α_2 -macroglobulina y apolipoproteína A1 se midieron por inmunonefelometría a tiempo fijo en un analizador BN II (Dade Behring, Marburgo, Alemania). Los ensayos de α_2 -macroglobulina y haptoglobina se calibraron contra el material de referencia internacional CRM 470 (Dati, F. et al. (1996) Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 34, 517-520). La apolipoproteína A1 se normalizó según el patrón de IFCC (Albers, J.J. & Marcovina, S.M. (1989) Clin. Chem. 35, 1357-1361). Se excluyeron del estudio los pacientes para los que faltaron uno o más de los puntos de datos anteriormente mencionados. Basándose en α_2 -macroglobulina, haptoglobina, GGT, edad, bilirrubina, apolipoproteína A1 y sexo, se calculó una puntuación para el modelo de regresión logística binaria {Fibrotest}. Este modelo de regresión logística binaria conocido como Fibrotest se desarrolló por el Dr. T. Poynard (ref. 14, 15 y documento WO0216949) Los presentes inventores han usado la siguiente fórmula (derivada del documento WO0216949) en la presente invención: $f = 4,467 \times \text{Log}[\alpha_2\text{-macroglobulina (g/l)}] - 1,357 \times \text{Log}[\text{Haptoglobina (g/l)}] + 1,017 \times \text{Log}[\text{GGT (IU/l)}] + 0,0281 \times [\text{Edad (en años)}] + 1,737 \times \text{Log}[\text{Bilirrubina (\mu mol/l)}] - 1,184 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0,301 \times \text{Sexo (femenino=0, masculino=1)} - 5,540$. Los presentes inventores se refieren aquí al modelo de regresión logística binaria como se aplicó en el documento WO0216949. Los pacientes con cirrosis descompensada por motivos bioquímicos según la clasificación de Child-Pugh (al menos una de la siguiente: seroalbúmina $<3,5$ g/dl; bilirrubina total en suero >2 mg/dl, Relación Normalizada Internacional $>1,7$) se clasificaron en el grupo de 'Cirrosis descompensada' ($N=24$) y no se realizó biopsia para evitar el riesgo innecesario asociado al

estudio para estos participantes. En los otros 82 pacientes (en los que las contraindicaciones para una biopsia del hígado estuvieron ausentes), la etapa de fibrosis hepática se evaluó por una biopsia hepática percutánea, se puntuó según los criterios de METAVIR por un patólogo ciego a los resultados de GlycoCirrhoTest y {Fibrotest}. Se excluyeron del estudio los pacientes que se negaron a someterse a biopsia, o para los que no estuvo disponible una biopsia interpretable. Todos los datos recogidos y la etiología de la enfermedad crónica del hígado de los 106 pacientes descritos anteriormente pueden encontrarse en la Tabla 1.

Tabla 1 Los datos son la media (rango de intercuartiles) o número de casos (% de N). Características de los 106 pacientes con enfermedad crónica del hígado en estudio.

Características	Grupo en estudio (N= 82)	Cirrosis con descompensación bioquímica (N=24)
Edad, años	42 (35-60)	58 (52-62)
Sexo masculino	45 (55 %)	19 (79 %)
Etiología		
Alcoholismo crónico	4 (5 %)	12 (50 %)
VHC	63 (77 %)	8 (33 %)
VHB	6 (7 %)	2 (8 %)
Autoinmunitaria	7 (9 %)	1 (4 %)
Criptogénica	2 (2 %)	1 (4 %)
Etapa de la fibrosis		
Sin fibrosis (F0)	4 (5 %)	/
Fibrosis portal (F1)	24 (29 %)	/
Algunos septos (F2)	20 (24 %)	/
Numerosos septos (F3)	10 (12 %)	/
Cirrosis (F4)	19 (23 %)	15 (62 %)
F4 + CHC	5 (7 %)	9 (38 %)
Marcadores bioquímicos		
INR	1,07 (1,00-1,18)	1,4 (1,24-1,54)
Albúmina (g/dl)	4,2 (3,9-4,6)	2,7 (2,5-3,2)
Bilirrubina total (µmol/l)	9 (5-14)	55 (24-92)
Proteína total en suero (g/dl)	7,5 (7,0-8,0)	6,7 (6,3-7,1)
ALT (U/l)	23 (14-38)	10 (7-15)
AST (U/l)	30 (16-47)	27 (19-62)
GGT (U/l)	45 (22-128)	138 (47-224)
α2-macroglobulina (g/l)	1,98 (1,54-2,49)	1,77 (1,09-2,37)
Apolipoproteína A1 (g/l)	1,34 (1,06-1,65)	0,46 (0,28-0,84)
Haptoglobina (g/l)	0,73 (0,36-1,06)	0,01 (0,01-0,40)

10 El diagnóstico de la hepatitis B y C crónica se hizo por un aumento en el nivel de ALT (por encima del límite superior del normal) en al menos dos muestras de sangre durante un periodo de tiempo de 6 meses en presencia de tanto hepBsAg detectable o ADN del VHB como anticuerpos anti-VHC detectables y ARN del VHC. El diagnóstico de la hepatitis autoinmunitaria se hizo según los criterios publicados por el Grupo Internacional de la Hepatitis Autoinmune (Johnson, J.L. & McFarlane, I.G. (1993) *Hepatology* 18, 998-1005). Se estableció una historia de alcoholismo crónico por entrevista clínica.

15 En los pacientes con cirrosis, el diagnóstico de carcinoma hepatocelular (CHC) se hizo por detección de un aumento en α-fetoproteína y una técnica de obtención de imágenes (TAC o IRM) que demostró una lesión hipervascular. En ausencia de un aumento en α-fetoproteína, el CHC se diagnosticó cuando ambas técnicas de obtención de imágenes demostraron una región hipervascular. En pacientes en los que hubo duda sobre el diagnóstico, se realizó una biopsia con aguja gruesa de la lesión focal. El centro clínico en el que se realizó el diagnóstico es el centro de referencia para el CHC para Flandes, una región de baja incidencia de CHC de aproximadamente 6 millones de habitantes, principalmente caucásicos.

25 Los presentes inventores analizaron muestras de 58 pacientes con sospecha de alcoholismo crónico y admitidos por este motivo en el Departamento de Psiquiatría, Hospital Académico Stuivenberg en Amberes (una ciudad importante en la región de Flandes). Se midió la transferrina deficiente en hidratos de carbono por la prueba de % de CDT-TIA, Axis Biochemicals, Oslo, Noruega) y el grupo de muestras se dividió en dos subpoblaciones, siendo una positiva en la prueba de CDT (superior al 6 % de CDT) y la otra, negativa. Los detalles específicos del ámbito clínico psiquiátrico no permitieron obtener información más detallada sobre este grupo de pacientes, así los presentes inventores no pudieron evaluar la etapa de la enfermedad del hígado y solo usan este grupo de pacientes aquí para estudiar la influencia de niveles elevados de CDT en los marcadores de diagnóstico de cirrosis de los presentes inventores. Se incluyeron veinticuatro muestras de pacientes con tanto artritis reumatoide, espondilitis anquilosante como enfermedad de Crohn, diagnosticados con estos trastornos por profesionales clínicos especializados en el

35 Departamento de Reumatología del Hospital Universitario de Gante.

Para establecer valores de referencia para los glicanos medidos, se estudió un grupo de control de 60 donantes de sangre conforme a los patrones de salud de la Cruz Roja (negativos para VHB, VHC y VIH). Estas muestras se obtuvieron del Centro de Transfusiones de la Cruz Roja en Gante, Bélgica.

8. Purificación de inmunoglobulinas del suero usando cromatografía de afinidad ProtL y perfilado de N-glicanos de las preparaciones resultantes

Se mezclaron 5 µl de suero con 130 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con 40 µl de resina de afinidad por proteína L-agarosa (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) durante 1 h en una rueda giratoria. Posteriormente, la resina se capturó sobre una placa de 96 pocillos revestida con membrana Durapore (Millipore, Bedford, Massachusetts) y se lavó ocho veces con 300 µl de PBS. A continuación, las inmunoglobulinas unidas se eluyeron dos veces con 250 µl de glicina 0,1 M a pH = 2,0. Las inmunoglobulinas en estas preparaciones se unieron a la membrana Immobilon P en una placa de 96 pocillos y el resto del procedimiento analítico de N-glicanos fue como se ha descrito (Callewaert, N. et al. (2001) *Glycobiology* 11, 275-281). Se cuantificaron los 7 picos más importantes en el perfil (no mostrados) que representan >95 % de la intensidad de señal total, y se normalizaron a la intensidad de señal total. Los datos para los Picos 1 y 7, relevantes para este estudio, se muestran a continuación (Tabla 2).

Tabla 2 Cuantificación de N-glicanos relevantes sobre inmunoglobulinas purificadas.

Identificador del paciente	Diagnóstico clínico	% de Pico 1 en el perfil de N-glicanos de inmunoglobulinas	% de Pico 7 en el perfil de N-glicanos de inmunoglobulinas
CD5	Enfermedad de Crohn	12,80	15,40
CD7	Enfermedad de Crohn	10,53	17,10
CD9	Enfermedad de Crohn	26,26	12,01
CD14	Enfermedad de Crohn	22,74	17,68
CD17	Enfermedad de Crohn	20,05	15,03
CD19	Enfermedad de Crohn	17,05	22,53
CD22	Enfermedad de Crohn	14,67	22,15
CD31	Enfermedad de Crohn	22,22	16,84
AS1	Espondilitis anquilosante	32,31	13,61
CS70	Espondilitis anquilosante	30,33	14,10
AS2	Espondilitis anquilosante	31,76	12,06
AS3	Espondilitis anquilosante	28,90	15,26
CS17	Espondilitis anquilosante	39,56	12,59
CS13	Espondilitis anquilosante	31,58	17,50
AS4	Espondilitis anquilosante	17,57	13,16
CS28	Espondilitis anquilosante	29,43	16,54
RA146	Artritis reumatoide	35,66	9,16
RA248	Artritis reumatoide	40,29	13,57
RA212	Artritis reumatoide	16,30	15,59
RA226	Artritis reumatoide	19,10	10,14
61,00	Artritis reumatoide	34,32	22,63
RA99	Artritis reumatoide	19,98	21,16
RA117	Artritis reumatoide	21,33	15,24
85,00	Artritis reumatoide	33,62	12,46
Promedio +/- DE		25,3 +/- 8,6	15,6 +/- 3,7
74M	Donante de sangre sano	18,00	5,01
65M	Donante de sangre sano	17,36	10,92
67M	Donante de sangre sano	18,68	7,29
80M	Donante de sangre sano	17,49	8,02
50M2	Donante de sangre sano	15,45	8,22
56M1	Donante de sangre sano	10,89	7,13
Promedio +/- DE		16,3 +/- 2,9	7,8 +/- 1,9

9. Análisis estructural parcial de los N-glicanos diferencialmente regulados (véase la Fig. 5)

En un estudio paralelo (Callewaert, N. et al. (2003) *Glycobiology* 13, 367-375), los presentes inventores ya asignaron la estructura de cuatro de los picos principales en el perfil de suero sano (estructuras y sus productos de exoglicosidasa mostrados como picos negros en la Fig. 5). La disponibilidad de estas estructuras simplificó considerablemente la tarea de seguimiento de los restantes picos diferencialmente regulados a lo largo de los perfiles. Los paneles de referencia en la Fig. 5 (paneles en la parte inferior de la columna 2 y 3) se generaron realizando digestiones con diferentes mezclas de exoglicosidasas en glicanos de referencia (Glyko, Novato, California) comercialmente disponibles altamente purificados con las estructuras desialiladas 6, 7 y 8 (numeración de

la Fig. 5). En todos los casos, se obtuvieron los productos de digestión esperados. Para comprimir el tamaño de la Fig. 5, los electroferogramas de estas digestiones de las estructuras 6 y 8 se combinaron en el panel, mostrado en la parte inferior de la segunda columna de la Fig. 5. Los electroferogramas de reacciones de digestión en la estructura 7 (que llevan un residuo de GlcNAc bisecante) se combinaron en el panel mostrado en la parte inferior de la tercera columna de la Fig. 5. Los diferentes picos no se tratan en orden numérico, sino en un orden que debe facilitar el argumento.

Pico 3

Se determinó que la estructura del Pico 3 (Callewaert, N. et al. (2003) *Glycobiology* 13, 367-375) era biantenaria, bi- β -1,4-galactosilada. La regulación por disminución de este glicano en CHC y/o cirrosis está de acuerdo con la elevada abundancia de su homólogo galactosilado por defecto y con el aumento de otros glicanos biantenarios, para los que este sustrato biantenario básico es el precursor.

Pico 8

Se determinó que el Pico 8 representaba la estructura de glicano tri- β -1,4-galactosilado triantenario ramificado en 2,4 (Callewaert, N. et al. (2003) *Glycobiology* 13, 367-375).

Pico 7

Este pico también está presente a abundancia relativamente baja en el perfil de suero de un paciente con hepatitis crónica (tercera flecha en el segundo panel de la columna de secuenciación izquierda en la Fig. 5) y en suero normal (no mostrado). Su secuenciación puede seguirse lo más fácilmente en la tercera columna de secuenciación, que muestra uno de los sueros más gravemente afectados en el conjunto de los presentes inventores. El Pico 7 es el tercer glicano más abundante en este perfil y ni este pico, ni ninguno de sus productos de digestión, co-migra con ninguno de los glicanos de referencia mencionados anteriormente o sus productos de digestión. Como no se observa co-migración debida al digesto de exoglicosidasa cuádruple, esto significa que está presente un sustituyente que está ausente de estos glicanos de referencia. Después del digesto cuádruple, el producto de digestión del Pico 7 migra 1 unidad de glucosa más lento que el oligosacárido de núcleo de trimanosa, que significa que un sustituyente está presente sobre este núcleo de trimanosa con un tamaño de un monosacárido. Teniendo en cuenta los resultados de un estudio de mapeo por HPLC 3D de N-glicanos de glicoproteínas totales en suero sanos (Nakagawa H. et al., (1995) *Anal. Biochem.* 226, 130-138), esto puede solo ser un GlcNAc bisecante. Este sustituyente es resistente a la digestión con β -N-acetilhexosaminidasa de judía sable en las condiciones usadas aquí. Esta declaración se confirma por la resistencia a β -N-acetilhexosaminidasa del residuo de GlcNAc bisecante sobre un glicano de referencia fucosilado en el núcleo biantenario biseccionado, véase la Fig. 5, panel de referencia bajo la tercera columna de secuenciación). El digesto de fucosidasa induce un desplazamiento en la movilidad del Pico 7 de unidades de 1,2-glucosa, que señala la presencia de un residuo de fucosa ligado en núcleo- α -1,6. La digestión con β -1,4-galactosidasa suplementaria desplaza el pico otras 2 unidades de glucosa, que indica la presencia de dos residuos de β -1,4-galactosa. Así, los presentes inventores llegan a la conclusión de que el Pico 7 representa la estructura de glicano fucosilada en núcleo- α -1,6, bi- β -1,4-galactosilada, biantenaria bisecada. Este resultado se corrobora por la co-elución de todos los productos de digestión del Pico 7 con los productos de digestión correspondientes del glicano de referencia con esta estructura (panel inferior de la tercera columna de secuenciación en la Fig. 5). Este sustituyente de GlcNAc bisecante es el producto de la actividad de N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III) sobre la estructura representada por el Pico 6, la variante núcleo- α -1,6-fucosilada del Pico 3 (la estructura para el Pico 6 se determinó en el estudio adjunto (Callewaert, N. et al., (2003) *Glycobiology* 13, 367-375).

Pico 1

El Pico 1 desplaza las unidades de 1,2-glucosa tras la digestión con fucosidasa a la posición del glicano de referencia biantenario agalacto (primer pico en el panel de referencia en la parte inferior de la columna de secuenciación central). Además, tras la digestión con galactosidasa, el pico en esta posición se vuelve muy intenso debido a que el Pico 6 se desplaza a esta posición (estructura del Pico 6: glicano biantenario fucosilado en el núcleo con bigalacto). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que el Pico 1 es el glicano núcleo- α -1,6-fucosilado agalacto biantenario. Así, su regulación por incremento en el grupo de muestras de CHC y/o cirrosis señala una combinación de galactosilación por defecto y elevada fucosilación del núcleo de las glicoproteínas del suero.

Pico 2

La identificación de este pico es más difícil debido a su abundancia relativamente baja. Sin embargo, puede derivarse información suficiente para identificar positivamente su estructura: en el perfil resultante de la doble digestión con sialidasa y β -1,4-galactosidasa, el producto del Pico 7 co-migra exactamente con el Pico 2 en el panel de sialidasa. Posteriormente, como el Pico 2 no se observa en la columna de secuenciación izquierda (muestra de hepatitis) a esta escala, los presentes inventores pueden identificar sus productos de exoglicosidasa en el patrón de digestión doble de sialidasa + fucosidasa de las otras dos muestras, en las que el Pico 2 es detectable. Ya no está

presente pico en la posición del Pico 2 tras la digestión con fucosidasa, y solo hay un nuevo pico que puede ser el producto de digestión (subrayado en gris, primera flecha en el perfil de sialidasa + fucosidasa de la columna de secuenciación central). En el perfil de digestión triple (β -1,4-galactosidasa suplementaria), este pico se vuelve más intenso debido a que el producto de digestión del Pico 7 co-migra con él. La digestión suplementaria con hexosaminidasa no deja traza en un pico en esta posición. Esto conduce a los presentes inventores a la conclusión de que el Pico 2 representa la estructura núcleo- α -1,6-fucosilada de agalacto bisecada. Así, este pico posee una combinación de las alteraciones estructurales del Pico 3 y Pico 7, es decir, no está galactosilado y tiene un residuo de GlcNAc bisecante.

El Pico 9 se asignó antes (Callewaert, N. et al., (2003) *Glycobiology* 13, 367-375) y es un derivado fucosilado en la rama derivado de la estructura de trigalacto triantenaria.

En resumen, en cirrosis hepática, hay una elevada abundancia de N-glicanos galactosilados por defecto (Picos 1 y 2), un aumento de N-glicanos modificados con un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisecante (Picos 2 y 7) y una disminución de N-glicanos bi- y triantenarios completamente galactosilados (Picos 3 y 8).

10. Monitorización de fibrosis con un perfil de N-glicano sialilado

Se obtuvieron los perfiles de N-glicanos sialilados de la mezcla de proteínas total presente en 131 muestras de suero. Se proporcionaron 60 muestras por donantes de sangre sanos, negativos para VHB y VHC. Se supone que este grupo no tenía fibrosis hepática significativa (grado de fibrosis HAI 0), que posiblemente es una ligera subestimación. Se determinó histológicamente que 12 pacientes tenían solo fibrosis portal sin formación de puentes (grado de fibrosis HAI 1). 4 pacientes tuvieron fibrosis con formación de puentes (grado de fibrosis HAI 3) y 45 pacientes tuvieron fibrosis (grado de fibrosis HAI 4). Una explicación detallada de este experimento puede encontrarse en la leyenda de la Figura 9. El procesamiento de N-glicanos es como se describe en Materiales y métodos, excepto que se omitió una digestión con sialidasa.

Materiales y métodos

1. Muestras de suero y diagnóstico clínico.

El estudio clínico fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Gante. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes de suero. Una caracterización detallada de los pacientes y los procedimientos de diagnóstico clínico que se siguieron puede encontrarse en el Ejemplo 7.

2. Procesamiento de muestras del N-glicoma de proteínas del suero.

Los N-glicanos presentes en las proteínas en 5 μ l de los sueros (un total de 248) se liberaron después de la unión de la proteína a una placa de 96 pocillos revestida con Immobilon P, se derivatizaron con ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico, se desialillaron y se analizaron en un secuenciador de ADN ABI 377A⁵ (Applied Biosystems, Foster City, California). El protocolo optimizado para la liberación de glicanos y el marcado usando un ciclador térmico de PCR es el siguiente: Se añadió 1 μ l de un tampón de NH₄Ac 20 mM que contiene 10 % de SDS, pH = 7, a 5 μ l de suero en tubos de PCR. Los tubos se calentaron a 95 °C durante 5 min en un ciclador térmico de PCR estándar con tapa calentada. Después de enfriarse, se añadió 1 μ l de disolución al 10 % de NP-40 para neutralizar el efecto desnaturante del SDS sobre la N-glicosidasa F de péptido (PNGasa F, Glyko, Novato, California). Después de la adición de 1 mU de IUBMB de PNGasa F, los presentes inventores cerraron los tubos y los incubaron en el ciclador térmico a 37 °C durante 3 h. Posteriormente, los presentes inventores añadieron 8 μ l de NaAc 50 mM, pH 5,0, seguido de 2 μ U de sialidasa de *A. ureafaciens* (Glyko, Novato, California) e incubaron los tubos en el ciclador térmico a 37 °C durante 3 h. Se transfirió 1 μ l de la disolución resultante a un nuevo tubo de PCR y se evaporó a sequedad con el ciclador térmico abierto a 65 °C y los tubos abiertos. Esta evaporación se completa dentro de 5 min, después de lo cual se añadieron entonces 1,5 μ l de la disolución de marcado⁵ al fondo de los tubos. Entonces, los tubos fuertemente cerrados se calentaron a 90 °C durante 1 h (la elevada temperatura garantiza la rápida reacción cinética). Se añadieron 150 μ l de agua a cada tubo para detener la reacción y para diluir la marca a aproximadamente 100 pmol/ μ l. La disolución resultante se usó para análisis en el ABI 377 como se ha descrito anteriormente o en el ABI 310 equipado con capilares de análisis de ADN estándar de ABI de 47 cm según las siguientes especificaciones: como matriz de separación, los presentes inventores usaron una dilución 1:3 del polímero POP6 patentado en el tampón Genetic Analyser (todos los materiales de Applied Biosystems). Las mezclas de inyección se prepararon por dilución 1:25 de las disoluciones de glicano del suero derivadas de APTS (véase el párrafo previo) en formamida desionizada. La inyección fue durante 5 s a 15 kV, seguido de separación durante 18 min a 15 kV y 30 °C. Como patrón interno se usó la escalera de referencia Genescan 2500 (ABI) marcada con rodamina en la dilución especificada por el fabricante. No se necesitan alteraciones del hardware o software de secuenciación (véase más adelante) para realizar estos análisis, excepto el acoplamiento de un baño de refrigeración externo al ABI 377 como se ha descrito antes⁵.

3. Procesamiento de datos.

Se realizó el análisis de datos usando el software Genescan 3.1 (Applied Biosystems). Los presentes inventores cuantificaron las alturas de los 14 picos que fueron detectables en todas las muestras para obtener una descripción numérica de los perfiles y analizaron estos datos con SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). La suposición de normalidad de las variables con respecto a las poblaciones estudiadas se evaluó usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov al nivel de significancia de 0,05. El análisis unilateral de la varianza fue seguido de las pruebas de diferencia honestamente significativas de Tukey a $\alpha_{FW} = 0,0001$. Los presentes inventores usaron análisis de curvas de características operativas del receptor (ROC) en SPSS 11.0 para evaluar la eficiencia de clasificación de las posibles variables de diagnóstico. Las curvas en la Fig. 4 se obtuvieron usando la regresión no paramétrica de Lowess.

4. Análisis estructural parcial del conjunto de N-glicanos por secuenciación de matrices de exoglicosidasa.

Se sometieron lotes de 1 μ l de N-glicanos marcados con APTS como se han obtenido según el procedimiento descrito anteriormente a digestión con diferentes mezclas de exoglicosidasas en NaAc 20 mM a pH 5,0. Las enzimas usadas fueron: sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (2 U/ml, Glyko); β -1,4-galactosidasa de *Diplococcus pneumoniae* (1 U/ml, Boehringer, Mannheim, Alemania); β -N-acetilhexosaminidasa de judía sable (30 U/ml, Glyko) y α -fucosidasa de epidídimo bovino (0,5 U/ml, Glyko). Las definiciones de unidades son como se especifican por los proveedores de enzimas. Después de completarse las digestiones, las muestras se evaporaron a sequedad, se reconstituyeron en 1 μ l de agua y se analizaron en un ABI377 como se ha descrito anteriormente.

Referencias

1. Staudt L.M. Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1777-1785 (2003).
2. Wulfkühle, J.D., Liotta, L.A. & Petricoin, E.F. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 267-275 (2003).
3. Hanash S. Disease proteomics. *Nature* **422**, 226-232 (2003).
4. Brindle, J.T. et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics. *Nat. Med.* **8**, 1439-1444 (2002).
5. Callewaert, N., Geysens, S., Molemans, F. & Contreras, R. Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment. *Glycobiology* **11**, 275-281 (2001).
6. Opanasopit, P. et al. In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G879-889 (2001).
7. Lee, S. J. et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* **295**, 1898-1901 (2002).
8. Ashwell, G. & Harford, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 531-554 (1982).
9. Parekh, R.B. et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**, 452-7 (1985).
10. Cadranel, J.F., Rufat, P. & Degos, F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. *Hepatology* **32**, 477-481 (2000).
11. Menon, K.V. & Kamath, P.S. Managing the complications of cirrhosis. *Mayo Clin. Proc.* **75**, 501-509 (2000).
12. Kuper, H. et al. The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis. *Hepatology* **34**, 714-718 (2001).
13. Piccinino, F., Sagnelli, E., Pasquale, G. & Giusti, G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J. Hepatol.* **2**, 165-173 (1986).
14. Imbert-Bismut, F. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* **357**, 1069-1075 (2001).
15. Poynard, T. et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J. Viral. Hepat.* **9**, 128-133 (2002).
16. Henderson, A.R. Assessing test accuracy and its clinical consequences: a primer for receiver operating characteristic curve analysis. *Ann. Clin. Biochem.* **30**, 521-539 (1993).
17. Noe, D.A. Selecting a diagnostic study's cutoff value by using its receiver operating characteristic curve. *Clin. Chem.* **29**, 571-572 (1983).
18. The METAVIR cooperative group. Inter-and intra-observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology* **20**, 15-20 (1994).
19. Bellentani, S. et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology* **20**, 1442-1449 (1994).
20. Parekh, R.B. et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**, 452-7 (1985).
21. Stibler, H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin. Chem.* **37**, 2029-37 (1991).
22. Nakagawa, H. et al. Identification of neutral and sialyl N-linked oligosaccharide structures from human serum glycoproteins using three kinds of high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **226**, 130-138 (1995).
23. Miyoshi, E. et al. Gene expression of N-acetylglucosaminyltransferases III and V: a possible implication for liver regeneration. *Hepatology* **22**, 1847-1855 (1995).
24. Ishibashi, K. et al. N-Acetylglucosaminyltransferase-III in human serum, and liver and hepatoma tissues -

- increased activity in liver cirrhosis and hepatoma patients. *Clin. Chim. Acta* **185**, 325-332 (1989).
25. Sawamura, T. et al. Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma. *Gastroenterology* **87**, 1217-1221 (1984).
 - 5 26. Ise, H., Sugihara, N., Negishi, N., Nikaido, T. & Akaike, T. Low asialoglycoprotein receptor expression as markers for highly proliferative potential hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 172-182 (2001).
 27. Poynard, T. et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **122**, 1303-1313 (2002).

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica en un mamífero, que comprende:

- 5 a) generar un perfil de N-glicomas del suero de hidratos de carbono ligados en N o fragmentos de oligosacáridos derivados de los mismos, o derivados marcados de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos, o características de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos que se determinan por la estructura de dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos; estando dichos hidratos de carbono ligados en N o dichos fragmentos presentes en u obtenidos de las proteínas totales en
 10 b) medir en el perfil de la etapa a) la cantidad de al menos un hidrato de carbono ligado en N o un fragmento de oligosacárido derivado del mismo o un derivado marcado de dicho hidrato de carbono ligado en N o dicho fragmento, o una característica de al menos un hidrato de carbono ligado en N o fragmento derivado del mismo presente en dicho perfil de hidratos de carbono ligados en N, y
 15 c) comparar los datos medidos obtenidos en la etapa b) con datos medidos obtenidos de perfiles derivados de mamíferos libres de fibrosis hepática con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica o, comparar los datos obtenidos en la etapa b) con datos previamente medidos en dicho mamífero con el fin de distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica y
 20 d) atribuir los resultados de la comparación obtenida en la etapa c) para distinguir enfermedad del hígado cirrótica temprana de fibrótica.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un hidrato de carbono ligado en N está seleccionado del grupo que consiste en:

- 25 i) $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$ (glicano 1),
 ii) $\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$ (el glicano 2),
 iii) $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{GlcNAc}(\beta-1,4)][\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)[\text{Fuc}(\alpha-1,6)]\text{GlcNAc}$ (glicano 7),
 30 iv) $\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)]\text{Man}(\alpha-1,3)[\text{Gal}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,2)\text{Man}(\alpha-1,6)]\text{Man}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}(\beta-1,4)\text{GlcNAc}$ (el glicano 8),
 v) un fragmento de oligosacárido derivado del glicano 1, 2, 7 u 8,
 vi) un derivado sialilado del glicano 1, 2, 7 u 8,
 35 vii) una característica de glicano 1, 2, 7 u 8 o derivado o fragmento de oligosacárido del mismo.

3. Un método según la reivindicación 2, en el que dicha cantidad se mide como una cantidad relativa entre el glicano 1 y el glicano 8 y/o el glicano 2 y el glicano 8 y/o glicano 7 y el glicano 8 o un fragmento de oligosacárido, derivado sialilado o característica del mismo.

40 4. Un método según la reivindicación 3, en el que la cantidad relativa entre el glicano 2 y el glicano 8 o un fragmento de oligosacárido, derivado sialilado o característica del mismo se usa para medir un cambio lineal en la progresión de la fibrosis hepática.

45 5. Un método según las reivindicaciones 1-4, en el que dicho mamífero es un ser humano.

6. Un método para detectar fibrosis hepática o un cambio en la progresión de la fibrosis hepática en un mamífero según las reivindicaciones 1-5 que comprende además la medición de evaluaciones cuantitativas o cualitativas de la condición física del mamífero, tales como los parámetros de bioquímica clínica.

50 7. Un método según la reivindicación 6, en el que dicha medición de los parámetros de bioquímica clínica comprende medir niveles de α 2-macroglobulina, haptoglobulina, GGT, bilirrubina, apolipoproteína A1 y determinar la edad y sexo y calcular una puntuación para el modelo de regresión logística binaria Fibrotest.

Figura 1:

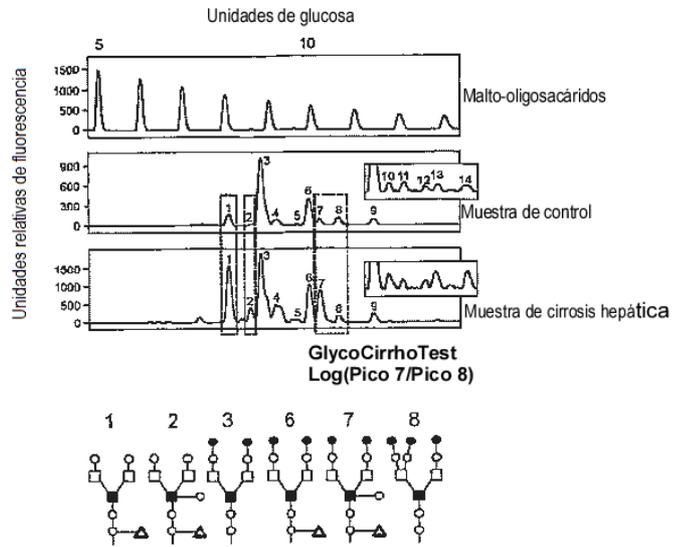


Figura 2:

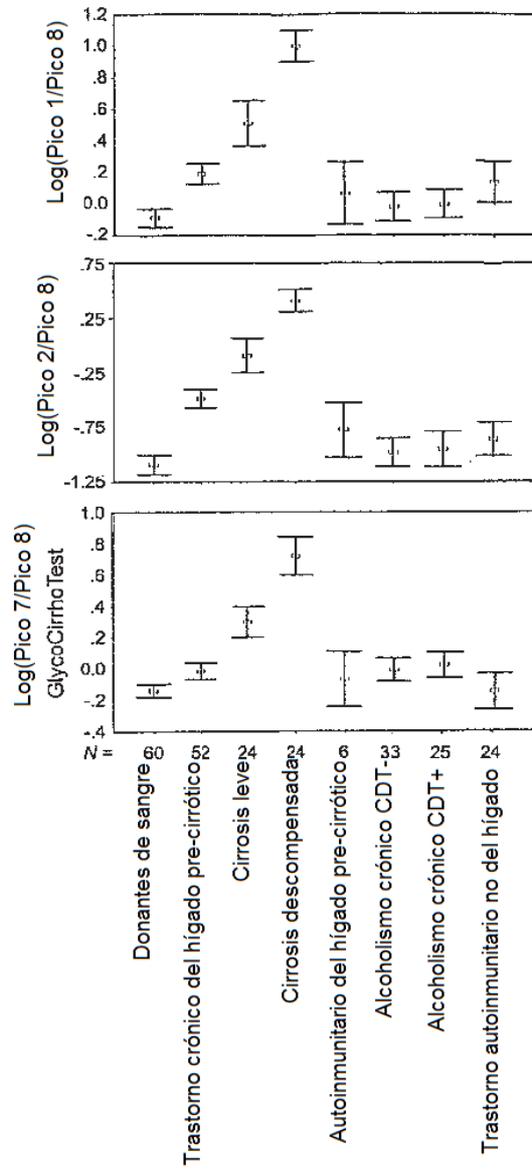


Figura 3:

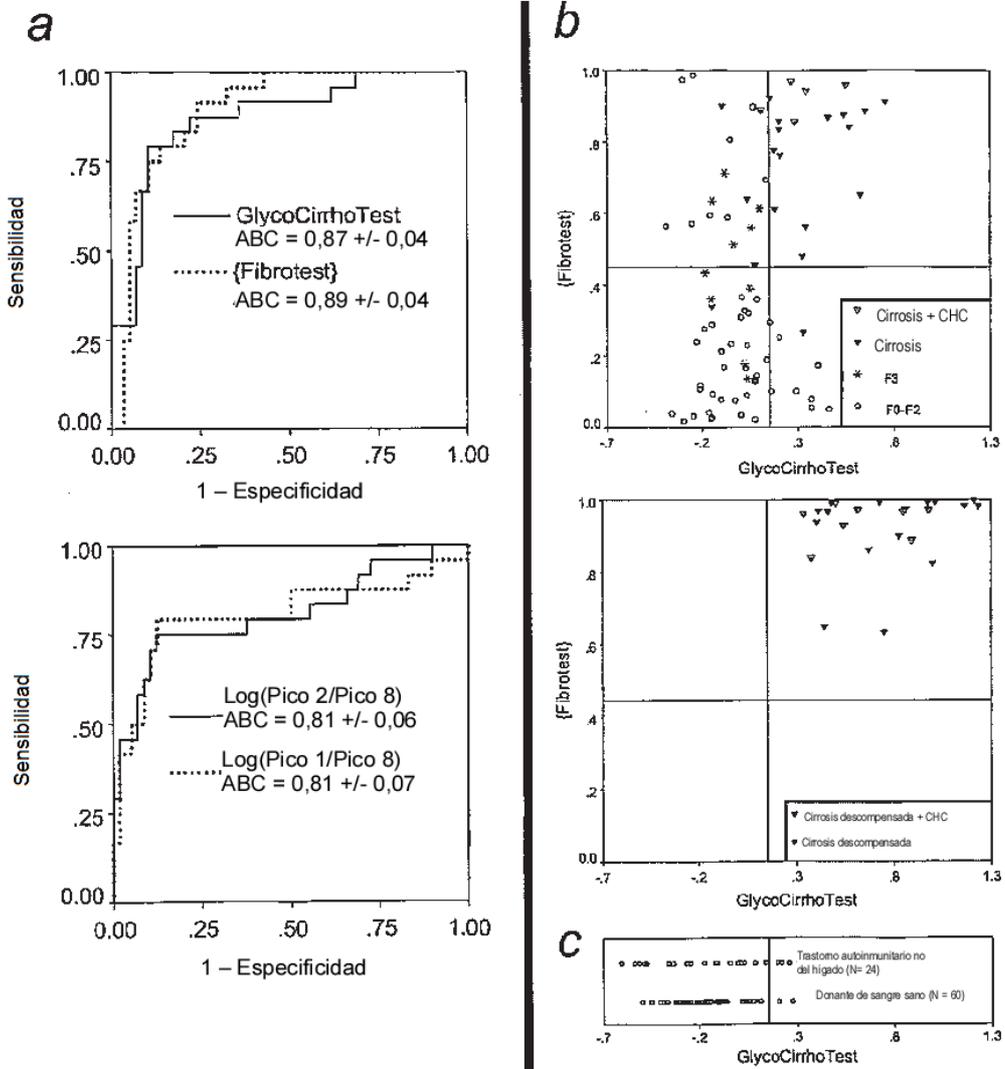


Figura 4:

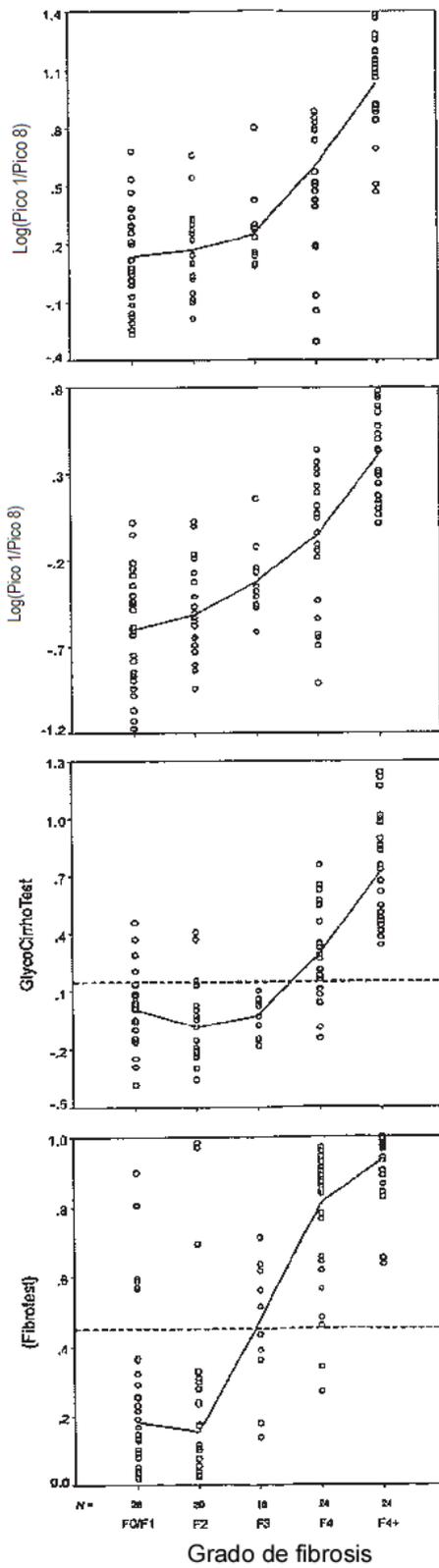


Figura 5:

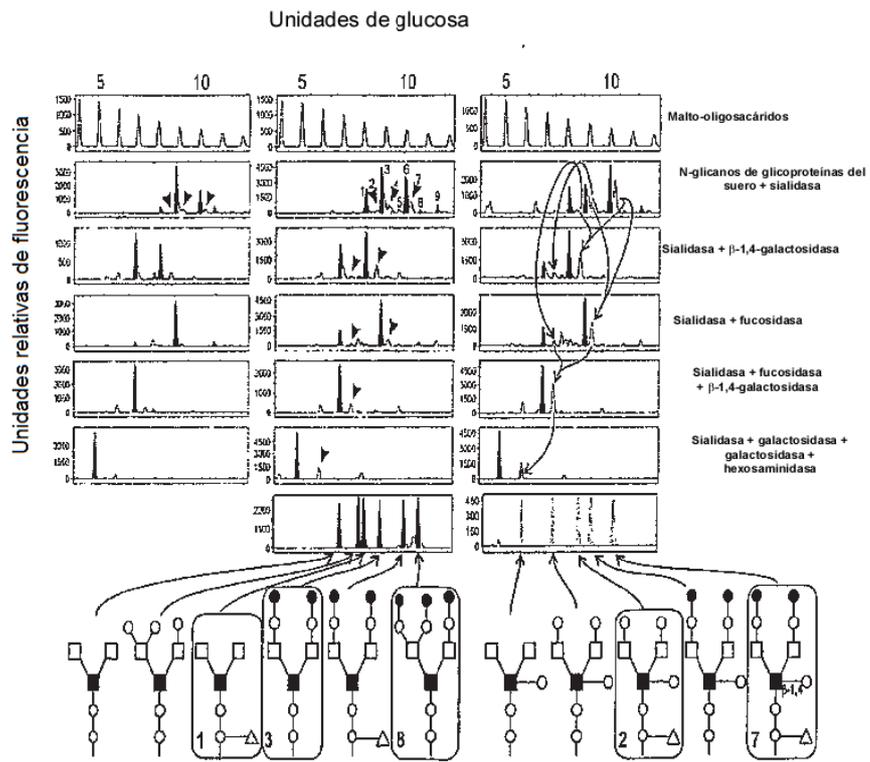


Figura 6:

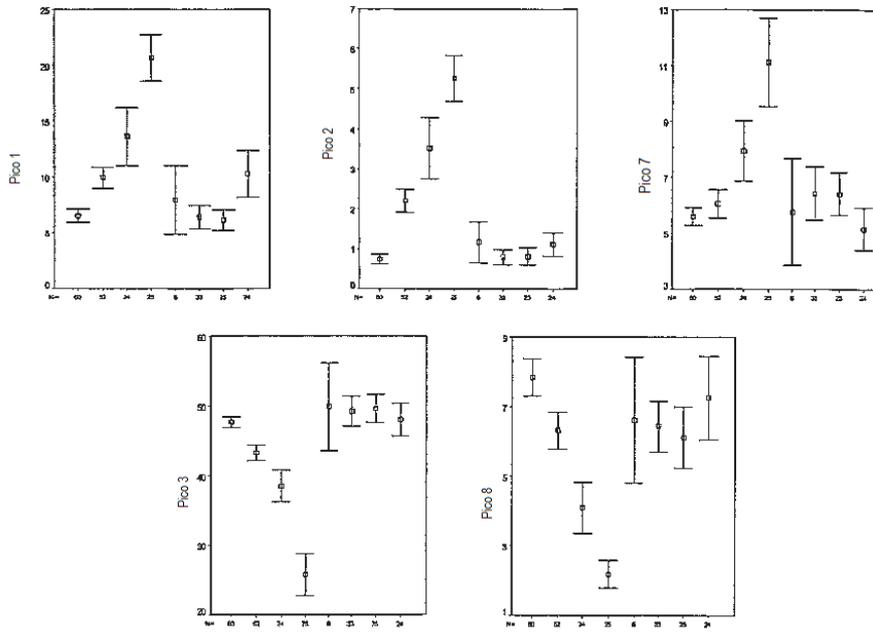


Figura 7:

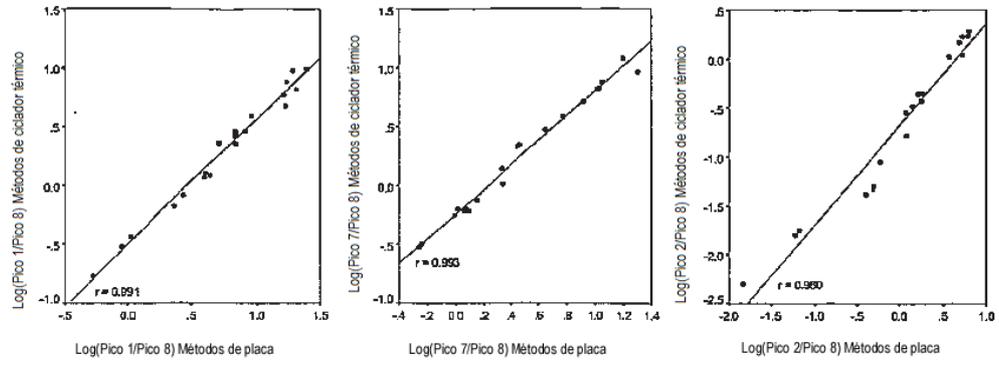


Figura 8:

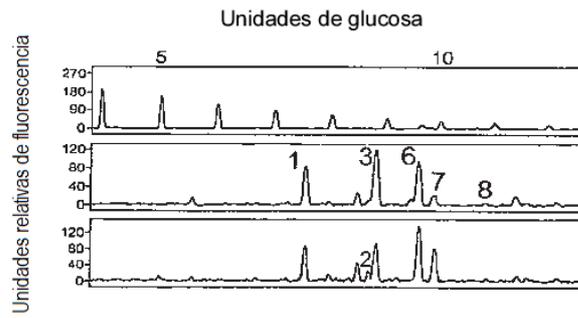


Figura 9:

