(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 971 966**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2019 PCT/EP2019/081801**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2020 WO20104458**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2019 E 19809018 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3884280**

(54) Título: **Métodos y kits para detectar disfunción hepática en un sujeto**

(30) Prioridad:

20.11.2018 EP 18306528

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2024

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL UNIVERSITAIRE DE LIMOGES (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE LIMOGES (33.3%)

(72) Inventor/es:

EL BALKHI, SOULEIMAN;
SAINT MARCOUX, FRANCK y
WOILLARD, JEAN-BAPTISTE

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Métodos y kits para detectar disfunción hepática en un sujeto

Campo

La presente divulgación está en el campo de la medicina.

Antecedentes

La mayoría de las hepatopatías crónicas son notoriamente asintomáticas, hasta que se produce cirrosis con descompensación clínica [1, 2]. La prevención de la cirrosis y el uso de estrategias de diagnóstico precoz, antes y una vez que se desarrolle, son vitales para mantener a los pacientes en un estado asintomático y retrasar la descompensación y, por tanto, mejorar el desenlace clínico. Esto es particularmente crítico en pacientes trasplantados de hígado. En la cirrosis precoz, las pruebas de laboratorio y de obtención de imágenes convencionales, a menudo combinadas en puntuaciones, pueden conducir a un diagnóstico negativo falso [2]. A pesar de su falta de sensibilidad y especificidad, estas pruebas se usan de manera rutinaria para explorar la integridad de los hepatocitos (aspartato transaminasa y alanina transaminasa), así como de las vías biliares (fosfatasa alcalina y γ-glutamiltransferasa) y funciones de síntesis (amoníaco, tiempo de protrombina y albúmina).

Dado que la albúmina sérica humana (HSA) se sintetiza y madura exclusivamente en el hígado, no sólo su cantidad (normalmente el 60 % de todas las proteínas sanguíneas), sino también su calidad pueden reflejar una disfunción hepática. De hecho, la albúmina presenta una estructura tridimensional peculiar, con múltiples sitios de unión para múltiples ligandos endógenos y exógenos (actúa como el principal fagocito de la sangre).

La albúmina experimenta varias modificaciones postraduccionales en los hepatocitos, que incluyen: acetilación, cisteinilación, homocisteinilación, glutationilación, glicosilación, glicación, nitrosilación, nitración, fosforilación y oxidación. La relevancia clínica de algunas de estas modificaciones ha sido investigada recientemente en hepatopías avanzadas (1-4)[1-4]. Tales modificaciones en la estructura de la HSA se traducen en modificaciones de su conformación y propiedades de unión [5]. Este aspecto ha sido explotado por Bar-Or *et al.* en isquemia cardiaca, quien propuso la prueba de unión de albúmina y cobalto (ACB), también conocida como prueba de albúmina modificada por isquemia (IMA) [6]. La prueba IMA se basa en el hecho de que la isquemia cardiaca se asocia con modificaciones en la estructura de la albúmina y, por tanto, en la capacidad de un sitio de unión específico para unirse al cobalto. Desde la aprobación de la IMA como biomarcador de isquemia cardiaca por parte de la FDA (número de regulación: 862.1215; http://www.accessdata.fda.gov), esta prueba también ha sido investigada en hepatopatías que muestran correlación con la gravedad de la cirrosis. [7]. En resumen, la prueba IMA se realiza añadiendo CoCh y ditiotreitol al suero, seguido de una medición colorimétrica del complejo (Co libre)-ditiotreitol a 470 nm. Sin embargo, todavía se necesitan biomarcadores adicionales de disfunción hepática.

El documento WO2013/024100 da a conocer métodos para el diagnóstico y la prevención o el tratamiento de afecciones médicas asociadas con el estrés oxidativo, en particular hepatopatías, basándose los métodos en la determinación y cuantificación de la fracción de albúmina que se oxida irreversiblemente en la cisteína 34.

Ge *et al.* dan a conocer que la función de unión a la albúmina disminuye después de la resección hepática en pacientes con y sin cirrosis (Ge, Penglei *et al.* "Reduction in albumin binding function following liver resection in patients with and without cirrhosis". Transl Cancer Res 2016;5(6):756-764).

Sumario

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece una disfunción hepática que comprende medir las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina a albúmina sérica en el que dichas capacidades de unión medidas indican si el sujeto padece la disfunción hepática. La siguiente descripción detallada, figuras y ejemplos no están dentro del alcance de la presente invención y están presentes únicamente con fines de comprensión e ilustración.

Descripción detallada

La primera hipótesis es que todas las modificaciones principales de la HSA, debido a la diversidad de hepatopatías, puede revelarse indirectamente investigando la capacidad de unión para diferentes ligandos. Se informó de que cada uno de los siguientes ligandos tiene un sitio de unión específico en la HSA: (i) el oro (Au) se une preferencialmente a Cys34; (ii) el cobre (Cu) al sitio de unión N-terminal, (iii) el cadmio (Cd) al sitio de unión de múltiples metales, (iv) la L-tiroxina tiene 4 sitios de unión específicos (Tr1 - Tr4), y (v) se informó que la dansilsarcosina se une a un sitio de fármaco 3 o al sitio de unión de diazepam [8]. La segunda hipótesis es que las modificaciones de la conformación de la HSA y las propiedades de unión aparecen en estadios tempranos de lesiones celulares hepáticas, puesto que la HSA se sintetiza y madura exclusivamente en hepatocitos.

Por tanto, se cree que las modificaciones estructurales de la HSA más frecuentes pueden detectarse midiendo los ligandos libres (no unidos) después de realizar adiciones conocidas de suero del paciente con disoluciones que contienen los ligandos mencionados anteriormente. Esto es posible puesto que el Cu, Au y Cd cubren los sitios de unión a HSA principales, mientras que la dansilsarcosina y la L-tiroxina podrían reflejar sus modificaciones conformacionales puesto que sus sitios de unión están ubicados en las cavidades de la proteína. Después de eso, revelando las modificaciones de la HSA, puede detectarse la disfunción hepática antes que con pruebas de laboratorio o de obtención de imágenes convencionales. Curiosamente, todos los ligandos mencionados pueden medirse directamente usando un único single método tal como espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-EM) o espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Basándose en estas premisas, se presenta en este caso la prueba de unión mejorada en suero (SEB), una simple prueba de laboratorio de disfunciones hepáticas. La prueba de SEB se desarrolló analizando muestras de suero de pacientes con diferentes hepatopatías (cirrosis diagnosticada, pacientes con NASH sin cirrosis y pacientes con trasplante hepático...). También se realizaron experimentos en animales para explorar la precocidad de las modificaciones de HSA en el transcurso de disfunción hepática crónica.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto padece una disfunción hepática que comprende medir las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina a albúmina sérica en el que dichas capacidades de unión medidas indican si el sujeto padece una disfunción hepática.

En particular, las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina se comparan con sus valores de referencia predeterminados, y la detección de una diferencia entre las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina y los valores de referencia predeterminados indica si el sujeto padece una disfunción hepática.

En particular, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto padece una disfunción hepática que comprende i) determinar las capacidades de unión de albúmina sérica a oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina, ii) comparar las capacidades de unión determinadas en la etapa i) con sus valores de referencia predeterminados, en el que detectar la diferencia entre las capacidades de unión determinadas en la etapa i) y los valores de referencia predeterminados indica si el sujeto padece una disfunción hepática

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier organismo mamífero. El término sujeto incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica ninguna edad o sexo particular. Por tanto, se pretenden cubrir sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sea masculino o femenino.

Tal como se usa en el presente documento, el término “disfunción de hígado” “o “disfunción hepática” se refiere a un estado (por ejemplo, la gravedad de la enfermedad) en la que la función hepática disminuye en relación con un estado normal. La disfunción hepática es característica de las hepatopatías. Varios procesos patológicos agudos o crónicos conducen a disfunción hepática. Estos incluyen, pero no se limitan a, absceso hepático, cáncer de hígado, o bien primario o bien metastásico, cirrosis, tales como cirrosis provocada por el consumo de alcohol o cirrosis biliar primaria, absceso hepático amebiano, hepatitis autoinmunitaria, atresia de las vías biliares, coccidioidomicosis diseminada, infecciones hepáticas por hipertensión portal (tal como el virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D o virus de la hepatitis E), hemocromatosis, carcinoma hepatocelular, absceso hepático piógeno, síndrome de Reye, colangitis esclerosante, Enfermedad de Wilson, hepatotoxicidad inducida por fármacos, o insuficiencia hepática fulminante o aguda. En particular, el hígado es una esteatosis hepática no alcohólica. Tal como se usa en el presente documento, el término “esteatosis hepática no alcohólica” tiene su significado general en la técnica y pretende referirse al espectro de trastornos que resultan de una acumulación de grasa en los hepatocitos en individuos sin antecedentes de consumo excesivo de alcohol. En la forma más leve, NAFLD se refiere a esteatosis hepática. El término NAFLD también pretende abarcar la forma más grave y avanzada de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, carcinoma hepatocelular y esteatosis hepática inducida por virus (por ejemplo, VIH, hepatitis). El término “NASH”, tal como se usa en el presente documento, de manera colectiva se refiere al estado donde el hígado desarrolla un trastorno hepático (por ejemplo, inflamación, degeneración vacuolar, fibrosis, cirrosis o cáncer), o el estado donde el hígado puede inducir un proceso patológico de este tipo, y “NASH” se distingue de “esteatosis simple”; es decir, una afección en la que la grasa se acumula simplemente en el hígado, y que no progresa a otro afección que desarrolla un trastorno hepático.

En particular, el método de diagnóstico descrito en el presente documento se aplica a un sujeto que presenta síntomas de disfunción hepática sin haberse sometido al cribado rutinario para descartar todas las posibles

causas de disfunción hepática. Los métodos descritos en el presente documento pueden formar parte del conjunto rutinario de pruebas realizadas en un sujeto que presenta síntomas de disfunción hepática tal como ictericia, dolor e inflamación abdominal, inflamación en las piernas y los tobillos, picor en la piel, orina de color oscuro, heces de color pálido, heces de color sanguinolento, heces del color de la brea, fatiga crónica, nauseas o vómitos, pérdida de apetito, tendencia a presentar hematomas fácilmente... El método de la presente divulgación puede llevarse a cabo además de otras técnicas de diagnóstico que incluyen evaluación por ecografía (por ejemplo, elastografía), biopsia y/o cuantificación de al menos uno de biomarcadores adicionales tales como niveles en sangre de AST, ALT, ALP, TTT, ZTT, bilirrubina total, proteína total, albúmina, lactato deshidrogenasa, colinesterasa y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "albúmina sérica" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una proteína globular que en seres humanos se codifica por el gen *ALB*. La albúmina sérica es la proteína plasmática más abundante en mamíferos. La albúmina sérica es esencial para mantener la presión oncótica necesaria para una distribución apropiada de fluidos corporales entre compartimentos intravasculares y tejidos corporales. También actúa como portador de plasma por la unión no específica de varias hormonas esteroideas hidrófobas y como proteína de transporte para hemina y ácidos grasos. Además, la albúmina sérica tiene una semivida muy larga de aproximadamente 19 días, y su metabolismo es bien conocido. La albúmina también se ha usado ampliamente como estabilizador de proteínas en productos farmacéuticos comerciales (Sangastino *et al.* (2012), Blood, 120(12) 2405-2411). Una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo para albúmina sérica humana (HSA) se representa por SEQ ID NO:1 (número de registro primario de UniProtKB/Swiss-Prot P02768).

SEQ ID NO:1 >sp|P02768|ALBU_HUMAN Albúmina sérica OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPF
EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLF
FAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAV
ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLV
AASQAALGL

Tal como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a cualquier molécula que tiene un sitio de unión específico en la albúmina. En particular, el ligando se selecciona del grupo que consiste en oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "capacidad de unión" se refiere a la cantidad del ligando que la albúmina sérica puede unir en condiciones de equilibrio si se utiliza cada sitio de unión disponible en la proteína.

Normalmente, el método de la presente divulgación se lleva a cabo de la siguiente manera. En una primera etapa se prepara una muestra de suero obtenida del sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra de suero" se refiere a una muestra en la que una muestra de sangre se introduce en un vidrio seco, se deja coagular a temperatura ambiente, y después de lo cual se centrifugan. Luego se expone la muestra de suero a una cantidad predeterminada del ligando durante un tiempo suficiente para permitir que la albúmina sérica se una a dicho ligando. En particular, el tiempo de exposición puede variarse durante aproximadamente 1, 5 ó 10 segundos, o aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, 20 ó 30 minutos, o aproximadamente 1, 2, 3 ó 5 horas. En una tercera etapa, luego se mide la cantidad del ligando libre (no unido) en la muestra, en la que dicha medida indica la capacidad de unión de la albúmina sérica. Opcionalmente se calcula la razón entre la cantidad libre y la concentración de la albúmina sérica, en la que dicha razón indica la capacidad de unión de la albúmina sérica. Opcionalmente, la proteína contenida en la muestra se separa de la muestra antes de medir la cantidad del ligando libre. Normalmente dicha separación puede consistir en una centrifugación.

Por consiguiente, se preparan 5 muestras de suero independientemente y cada una se expone a una cantidad particular del ligando correspondiente. En particular, se preparan 5 recipientes (por ejemplo, tubos) que contienen una cantidad del ligando correspondiente. Luego se añade el suero de muestra al recipiente y finalmente después de separar las proteínas contenidas en la muestra normalmente mediante una centrifugación la cantidad del ligando libre se mide en la muestra en reposo.

En particular, la capacidad de unión (por ejemplo, la cantidad del ligando libre) se determina mediante espectrometría de masas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "puntuación de Child-Pugh" se refiere a un sistema para evaluar el pronóstico, incluyendo la concentración requerida de tratamiento y la necesidad de un trasplante de hígado, de una hepatopatía crónica, principalmente cirrosis. Se proporciona una previsión de la gravedad creciente de la hepatopatía y la tasa de supervivencia esperada. La puntuación de Child-Pugh se define mediante una clase diferente: "clase A" (CA) para la hepatopatía menos grave, "clase B (CB) para la hepatopatía moderadamente grave, "clase C" (CC) para la hepatopatía más grave.

Tal como se usa en el presente documento, el término "espectrometría de masas" o "EM" se refiere a una técnica analítica para identificar compuestos por su masa. EM se refiere a métodos de filtrado, detección y medición de iones basándose en su m/z. La tecnología de EM generalmente incluye (1) ionizar los compuestos para formar especies cargadas (por ejemplo, iones); y (2) detectar el peso molecular de los iones y calcular su m/z. Los compuestos pueden ionizarse y detectarse mediante cualquier medio adecuado. Un "espectrómetro de masas" generalmente incluye un ionizador y un detector de iones. En general, se ionizan una o más moléculas de interés, y los iones se introducen posteriormente en un instrumento espectrográfico de masas donde, debido a una combinación de campos magnéticos y eléctricos, los iones siguen una trayectoria en un espacio que depende de la masa ("m") y la carga ("z"). Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.204.500, titulada "Mass Spectrometry From Surfaces"; la patente estadounidense n.º 6.107.623, titulada "Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry"; la patente estadounidense n.º 6.268.144, titulada "DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry"; la patente estadounidense n.º 6.124.137, titulada "Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes"; Wright *et al.*, Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2:264-76 (1999); y Merchant y Weinberger, Electrophoresis 21:1164-67 (2000).

Normalmente las muestras de suero se procesan para obtener preparaciones que son adecuadas para el análisis mediante espectrometría de masas. Tal purificación incluirá habitualmente cromatografía, tal como cromatografía de líquidos o electroforesis capilar, y a menudo también puede implicar un procedimiento de purificación adicional que se realiza antes de la cromatografía. Pueden usarse diversos procedimientos para este fin dependiendo del tipo de muestra o el de cromatografía. Los ejemplos incluyen filtración, centrifugación, combinaciones de los mismos y similares. Luego puede ajustarse el pH de la muestra de suero. La muestra puede purificarse con una filtración. Luego puede purificarse el filtrado de esta filtración mediante cromatografía de líquidos y posteriormente someterse a un análisis de espectrometría de masas. Se han descrito diversos métodos que implican el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la purificación de muestras antes del análisis de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Taylor *et al.*, Therapeutic Drug Monitoring 22:608-12 (2000) (precipitación de manual de muestras de sangre, seguido de extracción en fase sólida en C18 manual, inyección en un HPLC para cromatografía es una columna analítica C18, y análisis de EM/EM); y Salm *et al.*, Clin. Therapeutics 22 Supl. B:B71-B85 (2000). Las columnas de HPLC disponibles comercialmente incluyen, pero se limitan a, intercambio iónico (tanto catiónico como aniónico) polar, interacción hidrófoba, fenilo, C-2, C-8, C-18, y recubrimiento polar en columnas poliméricas porosas. Durante la cromatografía, la separación de los materiales se efectúa mediante variables tales como la elección del eluyente (también conocido como "fase móvil"), elección de elución en gradiente y las condiciones del gradiente, temperatura, etc.

En particular, los ligandos se ionizan mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. La espectrometría de masas se realiza usando un espectrómetro de masas, que incluye una fuente de iones para ionizar la muestra fraccionada y crear moléculas cargadas para un análisis adicional. Las fuentes de ionización usadas en diversas técnicas de EM incluyen, pero no se limitan a, ionización electrónica, ionización química, ionización por electrospray (ESI), ionización de fotones, ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización, fotoionización a presión atmosférica (APPI), bombardeo atómico rápido (FAB)/ionización secundaria de líquidos (LSIMS), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), ionización por campo, desorción por campo, ionización por termospray/spray por plasma, desorción/ionización por láser mejorado de superficie (SELDI), plasma acoplado inductivamente (ICP) e ionización por haces de partículas. El experto en la técnica entenderá que la elección del método de ionización puede determinarse basándose en el analito que va a medirse, tipo de la muestra, el tipo de detector, la elección de modo positivo frente a negativo, etc. Después de haberse ionizado la muestra, los iones cargados positivamente creados de ese modo pueden analizarse para determinar m/z. los analizadores adecuados para determinar m/z incluyen analizadores de cuadropolo, analizadores de trampa de iones y analizadores de tiempo de vuelo. Los iones pueden detectarse usando uno de varios modos de detección. Por ejemplo, sólo pueden detectarse iones seleccionados usando un modo de monitorización de iones selectivo (SIM), o alternativamente, pueden detectarse múltiples iones usando un modo de barrido, por ejemplo, monitorización de reacción múltiple (MRM) o monitorización de reacción seleccionada (SRM). Se puede potenciar la resolución de la técnica de EM empleando "espectrometría de masas en tándem" o "EM/EM". En esta técnica, un ion precursor (también denominado ion predecesor) generado a partir de una molécula de interés puede filtrarse en un instrumento de EM, y el ion precursor fragmentarse posteriormente para producir uno o más iones fragmento (también denominados iones hijos o iones de producto) que luego se

analizan en un segundo procedimiento de EM. Mediante una selección cuidadosa de iones precursores, sólo los iones producidos mediante determinados analitos se hacen pasar a la cámara de fragmentación, donde la colisión con átomos de un gas inerte produce los iones fragmento. Puesto que tanto el precursor y los iones fragmento se producen de una manera reproducible en un conjunto dado de condiciones de ionización/fragmentación, la técnica EM/EM puede proporcionar una herramienta analítica extremadamente poderosa. Por ejemplo, la combinación de filtración/fragmentación puede usarse para eliminar las sustancias interferentes, y puede ser particularmente útil en muestras complejas, tales como muestras biológicas. Adicionalmente, los recientes avances en tecnología, tal como desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada con analizadores de tiempo de vuelo ("MALDI-TOF") permite el análisis de analitos a niveles de femtomoles en pulsos iónicos muy cortos. Los espectrómetros de masas que combinan analizadores de tiempo de vuelo con EM en tándem también son bien conocidos por el experto en la técnica. Adicionalmente, pueden combinarse múltiples etapas de espectrometría de masas en métodos conocidos como "EM/EM". Pueden emplearse diversas otras combinaciones, tal como espectrometría de masas EM/EM/TOF, MALDI/EM/EM/TOF, o SELDI/EM/EM/TOF.

En particular, dado que la mayoría de los ligandos son metales, puede preferirse la ICP-EM. La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-Em) es un tipo de espectrometría de masas que es capaz de detectar metales y varios no metales en concentraciones tan bajas como una parte en 10^{15} (parte por cuatrillón, ppq) en isótopos de fondo bajo no interferidos. Esto se logra ionizando la muestra con plasma acoplado inductivamente y luego usando un espectrómetro de masas para separar y cuantificar esos iones. La espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) es una técnica analítica usada para la detección de elementos químicos. Es un tipo de espectroscopia de emisión que usa el plasma acoplado inductivamente para producir átomos e iones excitados que emiten radiación electromagnética en longitudes de onda características de un elemento en particular. Es una técnica de llama con una temperatura de llama en un intervalo de 6000 a 10000 K. La intensidad de esta emisión es indicativa de la concentración del elemento dentro de la muestra.

Una o más etapas de los métodos pueden realizarse usando máquinas automatizadas. En particular, una o más etapas de purificación se realizan en línea, y más preferiblemente todas las etapas de purificación por CL y espectrometría de masas pueden realizarse de una manera en línea.

Normalmente, el valor de referencia predeterminado es un valor umbral o un valor de corte, que puede determinarse experimental, empírica o teóricamente. También puede seleccionarse de manera arbitraria un valor umbral basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, puede usarse una medición retrospectiva de la capacidad de unión en muestras históricas almacenadas adecuadamente para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de positivos falsos y negativos falsos). Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de característica operativa del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar la capacidad de unión en un grupo de referencia, puede usarse el análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles de expresión determinados en las muestras que van a analizarse, y así obtener un patrón de clasificación que tenga significación para la clasificación de la muestra.

El nombre completo de la curva ROC es curva característica operativa del receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se usa principalmente para pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y tasa de positivos falsos (1-especificidad). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anómalos de una prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se usa la sensibilidad como coordenada vertical y la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuanto mayor sea el área bajo la curva (AUC), mayor será la precisión del diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene tanto valores altos de sensibilidad como valores altos de especificidad. El valor AUC de la curva ROC está entre 1,0 y 0,5. Cuando el AUC>0,5, el resultado del diagnóstico mejora cada vez más a medida que el AUC se acerca a 1. Cuando el AUC está entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando el AUC está entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando el AUC es superior a 0,9, la precisión es alta. Este método algorítmico se realiza preferentemente con un ordenador. Puede usarse software o sistemas existentes en la técnica para dibujar la curva ROC, tales como: software de estadística médica MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATE-ROC.SAS, GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Maryland, EE. UU.), etc.

En particular, se determina una puntuación que está compuesta por las capacidades de unión medidas y en comparación con un valor de referencia en la que una diferencia entre dicha puntuación y dicho valor de referencia indica si el sujeto padece una disfunción hepática. Tal como se usa en el presente documento, el

término "puntuación" se refiere a un fragmento de información, habitualmente un número que transmite el resultado del sujeto en una prueba. Un sistema de puntuación de riesgos separa una población de pacientes en diferentes grupos de riesgo; en el presente documento el procedimiento de estratificación de riesgos clasifica los pacientes en grupos de riesgo muy alto, riesgo alto, riesgo intermedio y riesgo bajo.

En particular, el método de la divulgación comprende el uso de un algoritmo de clasificación. Tal como se usa en el presente documento, el término "algoritmo" es cualquier ecuación matemática, procedimiento algorítmico, analítico o programado, o técnica estadística que toma uno o más parámetros continuos y calcula un valor de salida, algunas veces denominado "índice" o "valor de índice". Los ejemplos no limitativos de algoritmos incluyen sumas, razones y operadores de regresión, tales como coeficientes o exponentes, transformaciones y normalizaciones de valores de biomarcadores (incluyendo, sin limitación, los esquemas de normalización basados en parámetros clínicos, tales como sexo, edad o grupo étnico), reglas y directrices, modelos de clasificación estadística y redes neuronales entrenadas en poblaciones históricas. De uso particular en la combinación de parámetros son los análisis de clasificación estadística y ecuaciones lineales y no lineales para determinar la relación entre niveles de dichos parámetros y el riesgo de pérdida de aloinjerto. De interés particular son algoritmos de clasificación estadística estructurales y sintácticas, y métodos de construcción de índices de riesgo, utilizando características de reconocimiento de patrones, incluyendo técnicas establecidas tales como correlación cruzada, el análisis de componentes principales (PCA), la rotación de factores, la regresión logística (LogReg) y el análisis de discriminante lineal (LDA), análisis discriminante lineal Eigengene (ELDA), análisis de datos topológicos (TDA), redes neuronales, algoritmo de máquinas de vectores de soporte (SVM) y algoritmo de bosques aleatorios (RF), árbol de particionamiento recursivo (RPART), así como otras técnicas de clasificación de árboles de decisión relacionadas, centroides reducidos (*shrunken*) (SC), StepAIC, k-ésimo vecino más próximo, potenciación, árboles de decisión, redes neuronales, redes bayesianas, máquinas de vectores de soporte, algoritmo de sistema de recomendación y modelos ocultos de Markov, entre otros. Pueden usarse otras técnicas en el análisis de peligros de supervivencia y tiempo hasta el evento, incluyendo los modelos de Cox, Weibull, Kaplan-Meier y Greenwood bien conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "algoritmo de clasificación" tiene su significado general en la técnica y se refiere a métodos de árboles de clasificación y regresión y la clasificación multivariante bien conocida en la técnica tal como se describe en los documentos US 8.126.690; WO2008/156617.

En particular, el método de la presente divulgación comprende el uso de un algoritmo de aprendizaje automático. El algoritmo de aprendizaje automático puede comprender un algoritmo de aprendizaje supervisado. Los ejemplos de algoritmos de aprendizaje supervisado pueden incluir estimadores promediados de una dependencia (AODE), redes neuronales artificiales (por ejemplo, retropropagación), estadísticas bayesianas (por ejemplo, clasificador ingenuo de Bayes, red bayesiana, base de conocimiento bayesiana), razonamiento basado en casos, árboles de decisión, programación lógica inductiva, regresión del proceso gaussiano, método grupal de manejo de datos (GMDH), autómatas de aprendizaje, cuantificación de vectores de aprendizaje, longitud mínima del mensaje (árboles de decisión, gráficos de decisión, etc.), aprendizaje vago, aprendizaje basado en instancias, algoritmo del vecino más cercano, modelado analógico, aprendizaje probablemente de aprendizaje aproximadamente correcto (PAC), reglas de ondulación, una metodología de adquisición de conocimientos, algoritmos de aprendizaje automático simbólico, algoritmos de aprendizaje automático subsimbólico, máquinas de vectores de soporte, bosques aleatorios, conjuntos de clasificadores, agregación de arranque (embolsado) y potenciación (por ejemplo, XGBoost). El aprendizaje supervisado puede comprender clasificación ordinal, como análisis de regresión y redes difusas de información (IFN). Alternativamente, los métodos de aprendizaje supervisado pueden comprender clasificación estadística, como AODE, clasificadores lineales (por ejemplo, discriminante lineal de Fisher, regresión logística, clasificador ingenuo de Bayes, perceptrón y máquina de vectores de soporte), clasificadores cuadráticos, k vecinos más próximos, potenciación, árboles de decisión (por ejemplo, C4.5, bosques aleatorios), redes bayesianas y modelos ocultos de Markov. Los algoritmos de aprendizaje automático también pueden comprender un algoritmo de aprendizaje no supervisado. Los ejemplos de algoritmos de aprendizaje no supervisados pueden incluir redes neuronales artificiales, agrupaciones de datos, algoritmos de maximización de expectativas, mapas autoorganizados, redes de funciones de base radial, cuantificación de vectores, mapas topográficos generativos, métodos de cuello de botella de información e IBSEAD. El aprendizaje no supervisado también puede comprender algoritmos de aprendizaje de reglas de asociación, como el algoritmo Apriori, el algoritmo Eclat y el algoritmo de crecimiento FP. También pueden usarse agrupamiento jerárquico, tales como agrupamiento de vínculo único y agrupamiento conceptual. Alternativamente, el aprendizaje no supervisado puede comprender un agrupamiento particional tales como el algoritmo K-medias y el agrupamiento difuso. En algunos casos, los algoritmos de aprendizaje automático comprenden un algoritmo de aprendizaje por refuerzo. Los ejemplos de algoritmos de aprendizaje por refuerzo incluyen, pero no se limitan a, aprendizaje por diferencia temporal, Q-learning y autómatas de aprendizaje. Alternativamente, el algoritmo de aprendizaje automático puede comprender un preprocesamiento de datos. En particular, el modelo de potenciación incluye el algoritmo XGBoost.

Por tanto, en particular, el método de la presente divulgación comprende a) medir las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina; b) implementar un algoritmo de clasificación en datos que comprenden las capacidades de unión medidas para obtener una salida de algoritmo; c) determinar la

probabilidad de que el sujeto padezca una disfunción hepática.

En particular, el algoritmo se implementa en ordenador usando procesadores informáticos, unidades de memoria, dispositivos de almacenamiento, software informático y otros componentes bien conocidos. Normalmente, el ordenador contiene un procesador que controla el funcionamiento general de ordenador mediante la ejecución de instrucciones de programas informáticos que definen tal operación. Las instrucciones del programa informático pueden almacenarse en un dispositivo de almacenamiento (por ejemplo, un disco magnético) y cargarse en la memoria cuando se desea la ejecución de las instrucciones del programa informático. El ordenador también incluye otros dispositivos de entrada/salida que permiten la interacción del usuario con el ordenador (por ejemplo, pantalla, teclado, ratón, altavoces, botones, etc.). Un experto en la técnica reconocerá que una implementación de un ordenador real podría contener también otros componentes.

En particular, el algoritmo se implementa usando ordenadores que funcionan en una relación cliente-servidor. Normalmente, en un sistema de este tipo, los ordenadores cliente están ubicados de manera remota desde el ordenador servidor e interactúan a través de una red. La relación cliente-servidor puede definirse y controlarse mediante programas informáticos que se ejecuten en los respectivos ordenadores cliente y servidor. En particular, los resultados pueden mostrarse en el sistema para su visualización, tal como por ejemplo con LED o una pantalla LCD. Por consiguiente, en particular, el algoritmo puede implementarse en un sistema informático que incluye un componente de back-end, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluye un componente de middleware, por ejemplo, un servidor de aplicaciones, o que incluye un componente de front-end, por ejemplo, un ordenador cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación, o cualquier combinación de uno o más de tales componentes de back-end, middleware o front-end. Los componentes del sistema pueden interconectarse mediante cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), por ejemplo, Internet. El sistema informático puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor generalmente están remotos entre sí y normalmente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de que los programas informáticos se ejecutan en los respectivos ordenadores y tienen una relación cliente-servidor entre sí.

En particular, el algoritmo se implementa dentro de un sistema informático en la nube basado en red. En dicho sistema informático en la nube basado en red, un servidor u otro procesador que está conectado a una red se comunica con uno o más ordenadores cliente a través de una red. Un ordenador cliente (por ejemplo, un dispositivo móvil, tal como un teléfono, una tableta o un ordenador portátil) puede comunicarse con el servidor a través de una aplicación de navegador de red que reside y funciona en el ordenador cliente, por ejemplo. Un ordenador cliente puede almacenar datos en el servidor y acceder a los datos a través de la red. Un ordenador cliente puede transmitir solicitudes de datos o solicitudes de servicios en línea al servidor a través de la red. El servidor puede realizar los servicios solicitados y proporcionar datos a el/los ordenador(es) cliente. El servidor también puede transmitir datos adaptados para hacer que un ordenador cliente realice una función específica, por ejemplo, realizar un cálculo, mostrar datos específicos en una pantalla, etc. Por ejemplo, el médico puede registrar los parámetros (es decir, datos de entrada), que luego transmite los datos a través de un enlace de comunicaciones de largo alcance, tal como una red de área amplia (WAN) a través de Internet a un servidor con un módulo de análisis de datos que implementará el algoritmo y finalmente devolverá el resultado (por ejemplo, la puntuación) al dispositivo móvil.

En particular, los resultados de salida pueden incorporarse en un sistema de soporte de decisiones clínicas (CDS). Estos resultados de salida pueden integrarse en un sistema de registro médico electrónico (EMR).

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un kit o dispositivo para realizar el método de la presente divulgación, que comprende medios para determinar las capacidades de unión tal como se describió anteriormente. En particular, los kits o dispositivos de la presente divulgación comprenden al menos un recipiente de recogida de muestras para la recogida de muestras. Los dispositivos y el recipiente de recogida incluyen, pero no se limitan a, jeringas, lancetas, tubos de recogida de sangre BD VACUTAINER®. En particular, el recipiente contiene una cantidad predeterminada del ligando. En particular, los kits o dispositivos descritos en el presente documento comprenden además instrucciones para usar el kit o dispositivo y la interpretación de resultados. En particular, el kit o dispositivo de la presente divulgación comprende además un microprocesador para implementar un algoritmo para determinar la probabilidad de que el paciente padezca una disfunción hepática. En particular, el kit o dispositivo de la presente divulgación comprende además una presentación visual y/o señal audible que indica la probabilidad determinada por el microprocesador. En particular, el kit o dispositivo de la presente divulgación comprende: i) un espectrómetro de masas; ii) un receptáculo en el que se coloca la muestra de suero, y que puede conectarse al espectrómetro de masas de modo que el espectrómetro de masas puede cuantificar la cantidad del ligando libre; iii) opcionalmente un microprocesador para implementar un algoritmo en datos para determinar la probabilidad de que el sujeto padezca una disfunción hepática y iv) una presentación visual y/o señal audible que indica la probabilidad determinada por el microprocesador.

La divulgación se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1. (A-D) Unión mejorada en suero de Cu, Cd, Au y dansilsarcosina.

Figura 2. (A-D) Discriminación entre pacientes de control sin hepatopatía y pacientes cirróticos mediante la prueba de SEB. Se realizaron adiciones conocidas de ligandos a sueros usando disoluciones a las siguientes concentraciones, expresadas como razones HSA/ligando ratios (concretamente 1 molécula de HSA para X átomos o moléculas de ligando): Cu 1/10, L-tiroxina 1/10, Au 1/100, dansilsarcosina 1/5. Se sometió a prueba el Cu en 18 pacientes, Au en 16 pacientes, L-tiroxina en 16 pacientes y dansilsarcosina en 6 pacientes únicamente. Las ordenadas representan la razón (μM de ligando libre)/(μM de HSA).

Figura 3. Determinación de isoformas de HSA en 18 pacientes cirróticos y 18 pacientes de control. Observación de altas abundancias de isoformas de HSA en todos los pacientes cirróticos.

Figura 4. (A-D) Discriminación entre pacientes no cirróticos y cirróticos mediante la prueba de SEB con concentraciones menores para Au, Cu y L-tiroxina. También se sometió a prueba el Cd en este grupo a una razón de 1/5 (HAS/Cd). ** significa p< 0,001. n= 12 para todos los ligandos en ambos grupos excepto L-tiroxina donde n=6.

Figura 5. (A-D) Evolución con el tiempo de la unión de ligandos en ratas después de la administración diaria durante 1, 3, 7, 10 y 14 días de dosis altas de etanol. Los grupos de ratas (n=9 cada uno) D1, D3, D7, D10 y D14 recibieron 0,4 g de etanol durante 1, 3, 7, 10 y 14 días respectivamente. * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 6. (A-D) Abundancias relativas de isoformas de albúmina en todos los grupos de ratas. Alb-Acet, Alb-Cys, Alb-Gly, y Alb-Glut significan albúmina acetilada, albúmina cisteinilada, albúmina glicosilada y albúmina conjugada con glutatión respectivamente. * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 7. (A-E) Discriminación entre pacientes de control sin hepatopatía y pacientes cirróticos mediante una prueba de SEB en la cohorte de desarrollo.

Figura 8. Determinación de las 3 isoformas de HSA más abundantes en 45 pacientes cirróticos y 45 pacientes de control.

EJEMPLO: La prueba de "unión mejorada en suero" como biomarcador de disfunción hepática

Métodos

Productos químicos:

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron para preparar las disoluciones de ligandos: cloruro de cobalto (II) (CAS: 7646-79-9), cloruro de oro (III) trihidratado (CAS: 16961-25-4), cloruro de cobre (II) (CAS: 7447-39-4), acetato de plata (CAS: 563-63-3), sal sódica de L-tiroxina pentahidratada (CAS: 6106-07-6). La sal de dansilsarcosina y piperidinio >95 % se adquirió de RareChemicals GmbH. Todas las disoluciones de ligandos se prepararon en agua purificada MiliQ. Se usó albúmina Vialebex®, 200 mg/ml para someter a prueba la capacidad de unión a HSA.

Pacientes y muestras

Todas las muestras de los pacientes procedían de restos de sangre de pruebas de laboratorio de bioquímica prescritas según el estándar de atención. Según la normativa francesa y las buenas prácticas clínicas para los estudios biomédicos, se informó a los pacientes y pudieron oponerse al uso de los restos de sus muestras de sangre en cualquier momento (artículo L1211-2 del CSP).

La cohorte estaba compuesta por pacientes cirróticos y pacientes sin disfunción hepática como controles. Se consideró que los pacientes estaban libres de disfunción hepática basándose en su diagnóstico clínico y sus pruebas bioquímicas de función hepática, concretamente, aspartato transaminasa, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, γ-glutamiltransferasa, bilirrubina y albúmina libres y totales.

Los pacientes cirróticos se incluyeron según el diagnóstico de los gastroenterólogos, sus pruebas bioquímicas de función hepática y sus puntuaciones de Child-Pugh.

Se obtuvieron plasmas o sueros mediante centrifugación de sangre a 3000 rpm durante 10 min a 4 ºC. Para la cohorte, la prueba de SEB se realizó en el plazo de 24 h de las pruebas de bioquímica. Cuando el volumen lo permitió, luego se almacenaron muestras de plasma o suero a -20 ºC para las pruebas de estabilidad.

Se determinaron las isoformas de HSA para todos los pacientes, tal como se describió a continuación.

Estudio de las capacidades de unión de HAS en pacientes sin disfunción hepática:

En una primera etapa, se han evaluado por separado la capacidad global del suero para unir Cu, Au, L-tiroxina, Cd y dansilsarcosina en pacientes sin disfunciones hepáticas. Se añadieron concentraciones crecientes de cada ligando a las muestras de suero de los pacientes para obtener razones teóricas de HSA/ligando (mol/mol) de 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000 cuando sea posible. Estas razones teóricas se calcularon basándose en una concentración sanguínea de HSA de 0,6 mM, que es una concentración promedio en sujetos sanos.

Para esta evaluación se usaron seis sueros diferentes (de seis pacientes diferentes) por razón y por ligando. Después de la incubación durante 30 minutos de las muestras de suero en las que se realizaron adiciones conocidas de un ligando, se ultracentrifugaron para medir el ligando no unido en los ultrafiltrados. En detalle,

se incubó suero (200 µl) durante 30 min a 4 ºC con los ligandos mencionados anteriormente con diferentes concentraciones de disoluciones (500 µl de soluciones a concentraciones crecientes de ligandos),

se ultrafiltró el suero incubado en filtros Amicon® con un punto de corte de 30 kDa,

luego se diluyó el ultrafiltrado (10 µl) en $HNO3_3$ 0,1 M antes del análisis usando un método de ICP-EM de elementos múltiples para la determinación de concentraciones de ligando libre (no unido). El método de ICP-EM midió Cu, Au, Cd, yodo (para L-tiroxina) y azufre (para dansilsarcosina) por separado o simultáneamente, dependiendo del contenido de la muestra.

Luego se calcularon los porcentajes de la cantidad de ligandos retenidos, así como las razones reales de HSA/ligandos unidos (mol/mol), ya que se conocía la concentración real de HSA en cada suero.

Esto permitió determinar la capacidad máxima del suero para unirse a cada ligando. Estos límites son la base de la prueba de SEB para discriminar el suero con formas modificadas de HSA del suero con HSA mayoritariamente nativa.

Comparación de capacidades de unión de HSA en pacientes cirróticos y controles (pacientes sin disfunción hepática)

Cohorte de descubrimiento

Después de establecer umbrales correspondientes a la retención de más del 90 % de cada ligando, se realizó la prueba de SEB en el suero de pacientes con cirrosis diagnosticada (n = 18) en comparación con pacientes sin disfunciones hepáticas (n = 18). Luego se realizó la prueba de SEB tal como se describió anteriormente, pero con diferentes soluciones que contenían ligandos, en concentraciones específicas proporcionales al umbral de unión de los ligandos. En resumen, se prepararon disoluciones de Cu, Au, dansilsarcosina y L-tiroxina a 5950 µM, 23800 µM, 11900 µM y 150 µM, respectivamente. Se incubaron las disoluciones por separado con 200 µl de suero para Cu, Au y dansilsarcosina y con 50 µl de suero para L-tiroxina.

Se determinaron las isoformas de albúmina en todas las muestras de suero de estos dos grupos tal como se describe a continuación.

En otro experimento, se analizaron muestras de suero de 12 pacientes cirróticos y 12 controles para estudiar el poder de discriminación de la prueba cuando se usan disoluciones de ligandos en concentraciones más bajas. Para ello, las concentraciones de las disoluciones de Cu, Cd y Au se establecieron en 1190 µM para Cu, 1190 µM para Cd, 11900 µM para Au y 75 para L-tiroxina 75 µM.

Cohortes de desarrollo

La prueba de SEB y la identificación de las isoformas más importantes de HSA, concretamente, HSA-Cys, HAS-Gly y HAS-Cys-Gly, se realizaron tal como se describió anteriormente en una cohorte de desarrollo que incluía 45 pacientes cirróticos y 45 pacientes sin insuficiencia hepática. El análisis estadístico se realizó para discriminar a los pacientes en una primera etapa y luego para discriminar a los pacientes según sus puntuaciones de Child-Pugh (clase A (CA): "enfermedad hepática menos grave", clase B (CB): "enfermedad hepática moderadamente grave", clase C (CC): "enfermedad hepática más grave"). El conjunto de datos se dividió en un conjunto de datos de entrenamiento (75 %) y de prueba (25 %) usando una tabla aleatoria. Los modelos de predicción se desarrollaron usando una potenciación de gradiente extremo (paquete R xgboost v0.90.0.2), que incluye 2 repeticiones de validaciones cruzadas de 3 grupos para isoforma sola o para ligandos de la prueba de SEB solo. Se evaluó la capacidad de discriminación global de enfermedad frente a no enfermedad y la discriminación para cada estadio de Child-Pugh de cirrosis. Se evaluaron los rendimientos en los datos de las pruebas y se dibujó la

matriz de confusión, así como la precisión global y su IC del 95 %.

Modelo animal:

También se organizó un experimento con animales para investigar el momento y la gravedad de la disfunción hepática en el que la prueba resulta positiva. En este experimento, se usaron altas dosis de etanol para inducir lesiones hepáticas en seis grupos de ratas Wistar macho (Janvier Labs, Francia). Cada grupo contenía de 6 a 9 ratas. Se administraron por vía oral dos ml de una solución de etanol al 50 % (0,4 g de etanol) durante 1 día en el 1er grupo, durante 3 días en el 2º grupo, durante 7 días en el 3º, durante 10 días en el 4º grupo y durante 14 días en el 5º grupo. Se recogieron sangre e hígado de las ratas sacrificadas 24 horas después de la última administración de etanol. Un grupo de control (n=9) recibió administración oral o una solución salina durante 14 días y se sacrificó a las ratas y se tomaron muestras el día 15. Se aplicó la prueba de SEB a las ratas de todos estos grupos. También se determinaron las isoformas de albúmina, tal como se describe a continuación, para todos los grupos.

Análisis de ICP-EM

Se construyeron curvas de calibración con 6 calibrantes para cada elemento. Las concentraciones oscilaron entre 10 y 100 µg/l para Cu, Cd, Au y azufre y entre 1 y 20 µg/l para L-tiroxina.

Se usó L-cisteína para la calibración de azufre y L-tiroxina para la calibración de yodo. Cu se midió Cu en *m/z* 65, Cd en *m/z* 112, Au en *m/z* 197, yodo en *m/z* 127 y azufre en *m/z* 48 tal como se describe en EL BALKHI *et al.* 2010 [9]. Para poder medir el azufre (^{32}S), interferido por $^{32}O_2$, se introdujo oxígeno como gas reactante en la celda de reacción del instrumento para generar ^{48}SO. Para esto, se usó el modo de discriminación de energía cinética (KED) con una velocidad de flujo de oxígeno de 0,3 ml/min. Esto se aplicó para todas las mediciones de elementos y para todos los puntos de calibración, controles y ultrafiltrados. Los ultrafiltrados se diluyeron con HNO_3 0,1 M cuando fue necesario.

Determinaciones de isoformas de HSA:

Para estudiar las modificaciones de la albúmina en todas las muestras, se llevó a cabo el análisis usando microcromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas Q-TOF de alta resolución (TripleTOF® 5600+, Sciex). Se diluyeron muestras de plasma o suero de todos los grupos estudiados con agua ultrapura a 1:1000 (v:v) y se inyectaron 5 µl del suero diluido. Para la separación cromatográfica de las isoformas de albúmina se usó una columna Eksigent C4 Chrom XP (100X0,3 mm; 3 µm), junto con una fase móvil disolvente A (0,1 % de ácido fórmico en agua ultrapura) y disolvente B (0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo). El análisis se realizó en modo gradiente, programado de la siguiente manera: 0-1 min, el 20 % de B; 1-5 min, del 20 % al 50% de B; 5-6 min, del 50 % al 95 % de B; 6-8 min, el 95% de B; 8-8,5 minutos; del 95 % al 20 % de B; 8,5-13 min, equilibrio con B al 20 %. El experimento duró 13 min y la velocidad de flujo total se mantuvo constante en 5 µl/min.

Se controlaron todos los parámetros de EM mediante Analyst® TF 1.7 (Sciex). Las razones m/z se barrieron en primer lugar desde m/z 400 y 1250 usando el modo de barrido de TOF-EM con un tiempo de acumulación de 2 s. Luego se desconvolucionaron los espectros de albúmina obtenidos dentro del intervalo de masas de 66.000 Da a 67.000 Da con el software PeakView 2.1 (Sciex). A partir de la intensidad del pico, se calculó la abundancia relativa de isoformas de albúmina en relación con la intensidad de la albúmina nativa.

Se aplicó el mismo método de determinación de isoformas al suero de rata obtenido a partir del experimento con animales.

Resultados

Capacidad de unión mejorada de suero/HSA

Al añadir concentraciones crecientes de Cu al suero, se observó que se retuvieron hasta 12 átomos de Cu por molécula de albúmina en el filtro de ultracentrifugación con una retención promedio del 95 %. Este porcentaje cayó al 40 % o menos cuando se añadió más Cu (figuras 1A a 1D). Las muestras de suero pudieron unir con el 100 % de retención hasta 150 átomos de Au, 50 átomos de Cd y 2,5 moléculas de dansilsarcosina por molécula de albúmina. Las muestras de suero pudieron unir al menos 10 moléculas de L-tiroxina con una retención del 100 %, pero la L-tiroxina no pudo someterse a prueba por encima de la razón 1/10 (HSA/L-tiroxina) debido a problemas de disolución. Para confirmar que la unión se debe únicamente a HAS y que no existe unión inespecífica a otras proteínas séricas, realizamos las mismas pruebas con una solución comercial de albúmina Vialebex® a 200 mg/ml (datos complementarios). Las capacidades de unión de la disolución comercial de HSA pura fueron equivalentes o superiores a las del suero del paciente: por ejemplo, la razón de retención Cu/HSA fue de 40 y la de Au/HSA de 150.

Basándose en estos resultados, se establecieron umbrales que pueden discriminar mejor la HSA nativa de la HSA modificada. Luego se prepararon disoluciones de Au, Cu, dansilsarcosina y L-tiroxina para obtener razones teóricas de 1/100, 1/10, 1/5 y 1/10, respectivamente. Luego, se incubaron las disoluciones con muestras de suero de pacientes cirróticos y de control, tal como se describió anteriormente.

Comparación de las capacidades de unión mejoradas en suero en pacientes cirróticos y pacientes sin disfunción hepática

Cohorte de descubrimiento

Entre los 18 pacientes cirróticos, la cirrosis se debió al alcohol solo en 8 pacientes, al alcohol y VHC en 1 caso, a un síndrome metabólico (NASH) en 5 casos, al alcohol y NASH en 3 casos, al alcohol, NASH e infección viral en 1 caso. Las concentraciones de albúmina oscilaron entre 18,2 y 34 g/l. Las puntuaciones de Child-Pugh para todos los pacientes se muestran en la tabla 1.

Au, dansilcarcosina y L-tiroxina pudieron discriminar con el 100 % de especificidad y sensibilidad a los pacientes cirróticos de los pacientes de control, tal como se muestra en las figuras 2A a 2D. Cu pudo discriminar a los pacientes cirróticos con una especificidad del 72 % pero con una sensibilidad del 100 %.

Se analizaron todos los 18 pacientes cirróticos y los 18 pacientes de control para determinar la abundancia de isoformas de HSA en su suero. Se observaron abundancias altas de isoformas de HSA en todos los pacientes cirróticos con la presencia de HSA cisteinilada (HSA-Cys), HSA glicada (HSA-Gly), HSA nitrosilada (HSA-NO3) y HSA cisteinilada y nitrosilada (HSA-Cys/NO3) significativamente aumentadas, tal como se muestra en la figura 3.

En una segunda etapa, luego se incluyeron 12 pacientes cirróticos y 12 pacientes de control para someter a prueba concentraciones menores para Cu, Au y L-tiroxina (1/5, 1/50 y 1/5, respectivamente). Adicionalmente, se sometió a prueba Cd en este grupo a una razón de HSA/Cd de 1/5. Todos los ligandos pudieron discriminar pacientes cirróticos con un 100 % de sensibilidad y especificidad tal como se muestra en las figuras 4A a 4D.

Cohorte de desarrollo

Tal como se muestra en las figuras 7A a 7E, los rendimientos de los ligandos de la prueba de SEB eran consistentes con los resultados previos: la especificidad (Sp) y la sensibilidad (Se) de Cu y Cd era del 98 %; L-tiroxina ofreció una Se del 85% y una Sp del 98 %; Se y Sp de Au fueron del 80 y el 98 %. Sin embargo, Se y Sp de dansilsarcosina fueron sólo del 75 % y el 98 %, respectivamente. Cuando todos los ligandos se tomaron juntos en un análisis de componentes principales, el grupo de pacientes cirróticos se separó visiblemente bien de los pacientes de control (datos no mostrados). Las 3 isoformas de HSA principales eran significativamente mayores en pacientes cirróticos en comparación con los pacientes de control tal como se muestra en la figura 8.

La cohorte incluyó 45 pacientes cirróticos y 45 pacientes sin disfunciones hepáticas. Entre los 45 pacientes cirróticos, se eliminaron 6 debido a la ausencia de clasificación formal de la enfermedad, pero estos pacientes se usaron para predecir los modelos finales. Así, el conjunto de entrenamiento incluyó 65 pacientes (12CA, 11CB, 6CC y 36 N) y las pruebas 19 pacientes (3 CA, 3 CB, 1 CC y 12 N).

Modelo uniclase para ligandos de prueba de SEB: cirrosis frente a no cirrosis

Los parámetros del mejor modelo para “uniclase de ligandos” fueron nrounds=5 (número de pases en los datos), max_depth=2 (profundidad máxima de un árbol), eta=0,3 (tasa de aprendizaje), colsample_bytree=0,25 (es la razón de submuestras de las columnas cuando se construye cada árbol), submuestra=0,5 (razón de submuestras de los casos de entrenamiento).

El rendimiento en el conjunto de datos de prueba fue excelente con una precisión de (IC del 95 %)=1 (0,82,1). Siete pacientes cirróticos y 12 pacientes con no disfunciones hepáticas se predijeron bien sin positivos falsos o negativos falsos.

Modelo uniclase para la isoforma de HSA: cirrosis frente a no cirrosis

Los parámetros del mejor modelo para la “uniclase de metales” fueron nrounds=5 (número de pases en los datos), max_depth=2 (profundidad máxima de un árbol), eta=0,3 (tasa de aprendizaje), colsample_bytree=0,25 (es la razón de submuestras de las columnas cuando se construye cada árbol), subsample=0,5 (razón de submuestras de los casos de entrenamiento).

El rendimiento en el conjunto de datos de prueba fue excelente con una precisión de (IC del 95 %)=0,95 (0,74, 0,999). Entre los 12 pacientes sin insuficiencias hepáticas, 12 se predijeron bien y sólo un paciente cirrótico no se predijo bien.

Modelo multiclase para ligandos de la prueba de SEB

Los parámetros del mejor modelo para "multiclase de metales" fueron nrounds=5 (número de pases en los datos), max_depth=2 (profundidad máxima de un árbol), eta=0,2 (tasa de aprendizaje), colsample_bytree=0,5 (es la razón de submuestras de las columnas cuando se construye cada árbol), subsample=1 (razón de submuestras de los casos de entrenamiento).

El rendimiento en el conjunto de datos de prueba ofreció una precisión de (IC del 95 %)=0,79 (0,54, 0,94). La matriz de confusión era de la siguiente manera:

Referencia

		Referencia		
Predicción	CA	CB	CC	N
CA	1	1	1	0
CB	2	2	0	0
CC	0	0	0	0
N	0	0	0	12

Modelo para multiclase de isoformas: predicción de puntuaciones de Child-Push

Los parámetros del mejor modelo para "multiclase de isoformas" fueron nrounds=5 (número de pases en los datos), max_depth=2 (profundidad máxima de un árbol), eta=0,1 (tasa de aprendizaje), colsample_bytree=1 (es la razón de submuestras de las columnas cuando se construye cada árbol), subsample=1 (razón de submuestras de los casos de entrenamiento).

El rendimiento de las isoformas de HSA en el conjunto de datos de prueba mostró una precisión de (IC del 95 %)=0,84 (0,60,0,97). Tres pacientes cirróticos de 7 no se predijeron bien.

Experimento con animales

Después de una administración diaria de 0,4 g de etanol (1,6 g etanol/kg de peso corporal) a los diferentes grupos de ratas, se observó un aumento significativo de AST en los grupos que recibieron etanol durante más de 7 días. Después de 10 días de administraciones de etanol, ALT era significativamente mayor que en el grupo de control. La fosfatasa alcalina (ALP), la bilirrubina libre y total permanecieron sin cambios en comparación con los controles (tabla 2). Las pruebas histológicas en el hígado de ratas del grupo D14 mostraron una fibrosis muy ligera (datos no mostrados). No fueron visibles daños en tejidos hepáticos en los otros grupos.

La prueba de SEB se realizó en el suero de todos los grupos de ratas usando Cu, Cd, L-tiroxina a umbrales 1/5 y Au a un umbral 1/50, tal como se describió anteriormente. Tal como se muestra en las figuras 5A a 5D, todas las ratas en el grupo D14 eran positivas para todos los ligandos sometidos a prueba. El suero de rata tenía capacidades de unión decrecientes para Au después del primer día de administración, pero esta capacidad se reestableció en el grupo D7. El mismo perfil se observó para la capacidad de unión de Cu y L-tiroxina. Sin embargo, la capacidad de unión de Cd sólo disminuyó en el grupo D14.

Micro-CL-HRMS mostró aumentos significativos de todas las isoformas de albúmina identificadas en estos grupos de ratas. Tal como se representa en las figuras 6A a 6D, la albúmina acetilada (Alb-Acet), la albúmina glicosilada (Alb-Gly) y la albúmina conjugada con glutatión aumentaron muy rápidamente mostrando diferencias significativas entre grupos. La albúmina cisteinilada (Alb-Cys) aumentó también en todos los grupos, excepto D7.

Descripción:

En este estudio, se ha demostrado que las capacidades de unión de los ligandos seleccionados son significativamente diferentes entre pacientes cirróticos y pacientes sin disfunciones hepáticas. Las capacidades de unión disminuidas en pacientes cirróticos eran paralelas a la presencia de isoformas de HSA significativamente mayores. Este permitió suponer que las modificaciones más importantes de la estructura de la albúmina debido a la disfunción hepática podrían revelarse midiendo la fracción no unida de ligandos específicos con los que se realizaron adiciones conocidas en suero. Varios estudios han informado de las modificaciones químicas y/o estructurales de la HSA en hepatopatías avanzadas.

Las modificaciones químicas de la albúmina han sido ampliamente revisadas en [7, 10]. La albúmina experimenta varias modificaciones postraduccionales incluyendo: acetilación, cisteinilación, homocisteinilación, glutationilación, glicosilación, glicación, nitrosilación, nitración, fosforilación y oxidación.

Aunque la oxidación podría afectar a varios residuos tales como metionina, lisina, arginina y prolina, la oxidación del residuo Cys34 es la más estudiada. Esta modificación se caracterizó basándose en el estado redox de Cys34 de la siguiente manera:

1. Mercaptalbúmina humana (HMA), la forma reducida y más abundante de la HAS (el 70-80 % de la HAS total en sujetos sanos),

2. No mercaptalbúmina 1 (HNA1), una forma reversiblemente oxidada (20 – 30 %) y

3. No mercaptalbúmina 2 (HNA2), la forma irreversible oxidada de la albúmina (< 5 %)[10].

La relevancia clínica de estas modificaciones se ha investigado recientemente en hepatopatías avanzadas (1-4,11,12)[1-4, 11, 12]. Las reducciones significativas en el porcentaje de HMA con un aumento concomitante en las isoformas HNA1 y HNA2 han sido bien documentadas en lesiones hepáticas terminales. También se ha informado que un aumento progresivo de las formas oxidadas de la HSA se detecta en pacientes cirróticos. En particular, lo niveles circulantes tanto de HNA1 como de HNA2 aumentaron en pacientes con cirrosis descompensada y, en un mayor grado, en aquellos con insuficiencia hepática crónica agudizada, un síndrome caracterizado por una tasa de mortalidad a corto plazo muy alta [2, 4, 7]. Curiosamente, en estos pacientes, el nivel de HNA2 se correlacionó significativamente con los parámetros de inflamación sistémica y se relacionó directamente con el pronóstico de la enfermedad. Recientemente, se informó de que los pacientes con hepatitis alcohólica grave (SAH) tenían un aumento significativo en la oxidación de la albúmina debido al entorno de estrés oxidativo relacionado con la enfermedad. En tales condiciones, la albúmina actúa como pro-oxidante y promueve un estrés oxidativo adicional e inflamación a través de la activación de neutrófilos [13]. Cabe destacar que, en este estudio, HNA2 aumentó sólo en SAH y no en los pacientes con cirrosis alcohólica crónicos.

También se informó de las alteraciones estructurales que implican sitios distintos de Cys34. Formas N- o C-terminales truncadas, así como glicadas, se hallaron en muestras de plasma de pacientes con cirrosis agudamente descompensada o hepatitis alcohólica grave [14]. También se ha informado de la dimerización de la HSA en pacientes con cirrosis descompensada, aunque existe controversia sobre su papel peyorativo en la enfermedad. Sin embargo, la isoforma homodimérica con truncamiento N-terminal se asoció independientemente a complicaciones de la enfermedad y pudo estratificar una supervivencia a 1 año [14]. Muy recientemente, se ha informado de que en pacientes con SAH, una unión en exceso de bilirrubina con albúmina ayuda a predecir la mortalidad a 3 meses y que esta unión excesiva contribuye a la disminución observada en la capacidad de unión de dansilsarcosina a albúmina [15].

Por tanto, para elaborar la prueba de SEB, se han seleccionado varios ligandos con sitios de unión específicos conocidos en la albúmina. Los sitios de unión se eligieron para cubrir las modificaciones de la HSA más importantes con relevancia clínica informada en disfunciones hepáticas. Sobre estas bases, se seleccionó Au por revelar modificaciones de Cys34 (16-18)[16-18], Cu por su alta afinidad al sitio N-terminal y el sitio multiunión B [18, 19], L-tiroxina por sus 4 sitios de unión distribuidos en las 4 cavidades de HSA (Tr1 a Tr4) [20], dansilsarcosina por su afinidad al sitio de fármaco 3 (o sitio de unión a diazepam), que también es el sitio de unión a bilirrubina [5], y Cd por su alta afinidad a los sitios de multiunión A (o sitio de unión a Cd) [8].

Se observó que el suero puede unirse a hasta 12 átomos de Cu, 150 átomos de Au, 50 átomos de Cd, 2,5 moléculas de dansilsarcosina y al menos 10 moléculas de L-tiroxina por molécula de albúmina. Estos valores eran mucho mayores que los teóricos y experimentales informados. Por ejemplo, se ha informado de que la HSA puede unirse a menos de 2 átomos de Cu [21]. Se ha confirmado posteriormente que sólo un sitio de unión específico, concretamente, NTS puede unirse a Cu, y que el sitio de unión de múltiples metales tiene una afinidad muy baja para Cu. En esta clase de estudios, se usaron principalmente estrategias de unión de metales que emplean diálisis de equilibrio [22, 23]. En los estudios posteriores, se usaron quelatos débiles de bajo peso molecular para impedir la hidrólisis del metal y la posterior polimerización y, por tanto, la unión no específica. En las condiciones experimentales del presente documento en la prueba de SEB, podría producirse obviamente la hidrólisis de metales lo que podría ser responsable de uniones no específicas debido a fuerzas de Van der Waals [23]. Estas uniones no específicas son incluso más importantes cuando disoluciones comerciales y puras de HSA se incuban con los ligandos del presente documento (datos complementados). La presencia de agentes de quelación débiles endógenos (tales como aminoácidos libres) en suero podría ser el motivo de esto. En un modelo *in silico* se puedo demostrar que la HSA puede unir covalentemente 2 átomos de cobre en 2 sitios de unión específicos y hasta 40 átomos de cobre en diferentes sitios de unión no específicos (datos no mostrados). Por tanto, se decidió aplicar la prueba de SEB con concentraciones menores de ligandos. Todos los ligandos sometidos pudieron discriminar entonces pacientes cirróticos de individuos no cirróticos con un 100 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad en la cohorte de descubrimiento. El rendimiento de la prueba de SEB fue excelente en la cohorte de desarrollo.

La naturaleza y abundancias relativas de las isoformas de HSA halladas en este análisis están de acuerdo con los resultados previos [2, 4, 12, 13, 15] y con los resultados de la prueba de SEB. De hecho, en comparación con

pacientes con funciones hepáticas normales, todos los pacientes cirróticos presentaron altos niveles de HSA modificada (nitrosilación, cisteinilación y glicación). La nitrosilación y cisteinilación se produce en Cys34 [1], lo que es consistente con una unión disminuida de Au a HSA en pacientes cirróticos. La glicación puede producirse en Lys199, Lys281, Lys439 y Lys525 [3], todos ubicados cerca de los sitios de L-tiroxina, lo que podría impedir que este ligando se una a HSA. Finalmente, se ha demostrado que la oxidación de Cys34 podría dar como resultado varios cambios conformacionales de HSA [5]. Altera la conformación y dinámica de todo el dominio I, así como de la interfase del dominio I/II, lo que da como resultado menores capacidades de unión de ligandos endógenos (L-Trp) y exógenos (cefazolina y verapamilo), cuyos sitios de unión están alejados de cys34. Este punto podría explicar la capacidad de unión decreciente de Cd en pacientes cirróticos. Se informa de que Cd se coordina con una His y cuatro carboxilatos; sin embargo, su ubicación es desconocida, pero debe estar alejado de Cys34 [23].

A pesar del número muy pequeño de pacientes, se observó que la capacidad de unión de HSA está más disminuida en pacientes con cirrosis alcohólica que en aquellos con cirrosis metabólica o cirrosis mixta (tabla 1). La isoforma HSA-Cys parece ser mayor en el primer grupo. La misma observación podría hacerse con los resultados de la prueba de SEB de Cu. Además, los pacientes con las puntuaciones Child y MELD más altas (pacientes 2, 3 y 8) tienen las mayores abundancias de HSA-Cys. El paciente 19 (no incluido en las estadísticas) tenía NASH sin cirrosis. La abundancia de su HSA-Cys se encuentra entre las más bajas, pero la unión de L-tiroxina y Au a HAS fue menor que en los pacientes de control y mayor que en los pacientes cirróticos. Esto podría explicarse por las modificaciones de los sitios de Cys34 y L-tiroxina y la ausencia de modificación en NTS, pero hasta el momento no se tiene ninguna pista que respalde esta hipótesis.

El modelo animal permitió demostrar que las modificaciones de la albúmina fueron principalmente acetilación, cisteinilación, glicación y glutationilación. La prueba de SEB fue positiva para Cd el día 14 y para Au y L-tiroxina tan pronto como D1. Las lesiones hepáticas después del D7 se confirmaron por el aumento de las concentraciones en suero de AST y ALT, marcadores de la integridad de los hepatocitos. Como la albúmina de ratas aún no ha cristalizado y su estructura tridimensional aún no se ha dilucidado, es difícil hallar el vínculo entre las modificaciones de la albúmina y las capacidades de unión. Sin embargo, los resultados sugieren que la prueba del presente documento puede revelar la enfermedad de los hepatocitos de manera temprana, antes que los biomarcadores bioquímicos actuales, y que la disminución de la capacidad de la albúmina para unirse al Cd pudiera ser un marcador de lesiones hepáticas más avanzadas.

TABLAS:

Tabla 1. La edad de los pacientes y la etiología de cirrosis se indica junto con sus puntuaciones de Child-Pugh y MELD. Las abundancias de las isoformas de albúmina identificadas son todas mayores que en los pacientes de control. Los porcentajes de isoformas se calculan basándose en la abundancia de la HSA nativa. Para todos los pacientes sometidos a prueba la prueba de SEB fue positiva en comparación con los pacientes de control excepto para Cu en algunos pacientes. Las razones se calculan de la siguiente manera: concentración de ligandos en los filtrados (μM)/concentración de albúmina (μg/l).

Paciente	Edad	Etiología de la cirrosis	Puntuación de MELD	Puntuación de Child-Pugh	HSA Cys (%)	HSA Gly (%)	HSA NO3 (%)	HSA Cys-NO3 (%)	Razón Au/HSA	Razón Cu/HSA	Razón LT/HSA	Razón DS/HSA
		Valores de referencia en pacientes de control (media+/-DE)			*0,63+/-0,11*	*0,39+/-0,04*	*0,48+/-0,02*	*0,42+/-0,06*	*10+/-7,9*	*4,3+/-1,6*	*0,09+/-0,03*	*0,23+/-0,26*
1	64	Alcohol	n.a	B	1,25	0,71	0,54	0,76	86,23	7,5	1,82	n.a
2	74		23	C14	1,16	0,57	0,57	0,73	57,8	4,97	0,86	n.a
3	69		23	C	1,84	0,81	0,63	1,21	120,09	9,33	3,04	n.a
4	47		9	B9	0,79	0,41	0,49	0,44	102,89	15,85	1,4	n.a
5	52		15	C12	0,77	0,53	0,58	0,61	n.a	5,5	n.a	n.a
6	73		16	B8	1	0,45	0,47	0,6	145,77	10,45	3,33	4,77
7	70		14	C10	0,83	0,54	0,49	0,5	84,18	9,07	2,71	2,26
8	72		24	C11	1,24	0,61	0,55	0,74	89,43	6,86	2,17	5,71
9	80	NASH	21	B9	0,9	0,53	0,53	0,64	n.a	9,64	n.a	n.a
10	70		n.a	n.a	0,89	0,61	0,62	0,73	n.a	7,54	n.a	n.a
11	77		n.a	n.a	0,83	0,6	0,52	0,55	61,55	6,74	2,06	7,58
12	77		n.a	A	0,82	0,38	0,44	0,47	46,25	4,76	1,92	0,78
13	75		7	n.a	0,88	0,46	0,54	0,61	64,58	5,59	1,72	n.a
14	80	Mezcla: alcohol y NASH	7	A5	0,66	0,46	0,49	0,45	97,75	8,25	2,15	n.a
15	80		29	B9	1,69	0,63	0,59	1,05	116,64	10,68	2,52	n.a
16	78		7	A6	0,73	0,39	0,47	0,45	87,56	11,02	2,55	16,38
17	62	Mezcla: alcohol y VHC	12	B9	0,89	0,54	0,52	0,59	39,78	5,26	1,52	n.a
18	50	Mezcla: VHC, alcohol y NASH	15	C	1,05	0,51	0,51	0,67	70,47	5,56	1,24	n.a
19	60	NASH sin cirrosis	n.a	n.a	0,73	0,35	0,45	0,41	59,64	5,1	1,9	n.a

Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas en ratas después de la administración diaria de etanol para diferentes lapsos de tiempo. El grupo D1 recibió etanol durante 1 día, D3 durante 3 días, D7 durante 7 días, D10 durante 10 días y D14 durante 14 días.

Pruebas	Ratas de control	Grupo D1	Grupo D3	Grupo D7	Grupo D10	Grupo D14
ALB (g/l)	14,4	13,8	12,4*	12,2*	16,35	12,9*
	[12,7-17,6]	[13,2-14,1]	[11,8-14,2]	[11,0-13,8]	[12,4-17,7]	[10,2-13,5]
AST (UI/l)	70,8	78	80	96*	92*	90*
	[61-75]	[70-85]	[52-144]	[75-157]	[81-157]	[85-294]
ALT (UI/l)	57	63	62	69	78*	82*
	[46-61]	[52-71]	[46-123]	[52-97]	[68-98]	[65-104]
ALP (UI/l)	196	232	180	159	172	230
	[101-325]	[153-304]	[121-329]	[84-263]	[100-222]	[110-327]
BILI. libre (µM)	0,75	0,7	0,7	0,7	0,8	0,6
	[0,6-1]	[0,3-1]	[0,5-1,3]	[0,4-4,4]	[0,5-1,1]	[0,4-0,7]
BILI. total (µM)	0,75	0,8	0,8	1	1	0,9
	[0,4-1,3]	[0,4-1,6]	[0,2-1,7]	[0,2-1,9]	[0,8-1,6]	[0,5-1,8]

Bibliografía

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta divulgación.

1. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, *et al* (2017) Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis. J Pharm Biomed Anal 144:138-153 . doi: 10.1016/j.jpba.2017.04.023

2. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, *et al* (2014) Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. Hepatol Baltim Md 60:1851-1860 . doi: 10.1002/hep.27322

3. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, *et al* (2016) Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. J Pharm Biomed Anal 122:141-147 . doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.048

4. Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, *et al* (2013) Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. J Hepatol 59:978-983 . doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.013

5. Kawakami A, Kubota K, Yamada N, *et al* (2006) Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. FEBS J 273:3346-3357 . doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05341.x

6. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV (2000) A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. J Emerg Med 19:311-315

7. Klammt S, Mitzner S, Stange J, *et al* (2007) Albumin-binding function is reduced in patients with decompensated cirrhosis and correlates inversely with severity of liver disease assessed by model for end-stage liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 19:257-263 . doi: 10.1097/MEG.0b013e3280101f7d

8. Fanali G, di Masi A, Trezza V, *et al* (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. Mol Aspects Med 33:209-290 . doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002

9. El Balkhi S, Poupon J, Trocello J-M, *et al* (2010) Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection. Anal Chem 82:6904-6910 . doi: 10.1021/ac101128x

10. Bonneau E, Tétreault N, Robitaille R, *et al* (2016) Metabolomics: Perspectives on potential biomarkers in organ transplantation and immunosuppressant toxicity. Clin Biochem 49:377-384 . doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.01.006

11. Spinella R, Sawhney R, Jalan R (2016) Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. Hepatol Int 10:124-132 . doi: 10.1007/s12072-015-9665-6

12. Stauber RE, Spindelboeck W, Haas J, *et al* (2014) Human nonmercaptalbumin-2: a novel prognostic marker in chronic liver failure. Ther Apher Dial Off Peer-Rev J Int Soc Apher Jpn Soc Apher Jpn Soc Dial Ther 18:74-78 . doi: 10.1111/1744-9987.12024

13. Das S, Maras JS, Hussain MS, *et al* (2017) Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis. Hepatol Baltim Md 65:631-646 . doi: 10.1002/hep.28897

14. Baldassarre M, Domenicali M, Naldi M, *et al* (2016) Albumin Homodimers in Patients with Cirrhosis: Clinical and Prognostic Relevance of a Novel Identified Structural Alteration of the Molecule. Sci Rep 6:35987 . doi: 10.1038/srep35987

15. Das S, Maras JS, Maiwall R, *et al* (2018) Molecular Ellipticity of Circulating Albumin-Bilirubin Complex Associates With Mortality in Patients With Severe Alcoholic Hepatitis. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc 16:1322-1332.e4 . doi: 10.1016/j.cgh.2017.11.022

16. Li Y, Yan X-P, Chen C, *et al* (2007) Human serum albumin-mercurial species interactions. J Proteome Res 6:2277-2286 . doi: 10.1021/pr0700403

17. Shen X-C, Liang H, Guo J-H, *et al* (2003) Studies on the interaction between Ag(+) and human serum albumin. J Inorg Biochem 95:124-130

18. Sokolowska M, Wszelaka-Rylik M, Poznański J, Bal W (2009) Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin. J Inorg Biochem 103:1005-1013 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.04.011

19. Peters T (1995) Ligand Binding by Albumin. In: All About Albumin. Elsevier, págs. 76-132

20. Petitpas I, Petersen CE, Ha C-E, *et al* (2003) Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. Proc Natl Acad Sci U S A 100:6440-6445 . doi: 10.1073/pnas.1137188100

21. Appleton DW, Sarkar B (1971) The Absence of Specific Copper(II)-binding Site in Dog Albumin A COMPARATIVE STUDY OF HUMAN AND DOG ALBUMINS. J Biol Chem 246:5040-5046

22. Masuoka J, Saltman P (1994) Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin. J Biol Chem 269:25557-25561

23. Sendzik M, Pushie MJ, Stefaniak E, Haas KL (2017) Structure and Affinity of Cu(I) Bound to Human Serum Albumin. Inorg Chem 56:15057-15065. doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b02397

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si un sujeto padece una disfunción hepática que comprende medir las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina a albúmina sérica en una muestra que se ha obtenido del sujeto en el que dichas capacidades de unión medidas indican si el sujeto padece una disfunción hepática.

2. Método según la reivindicación 1, en el que las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina se comparan con sus valores de referencia predeterminados, y la detección de una diferencia entre las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina y los valores de referencia predeterminados indica si el sujeto padece una disfunción hepática.

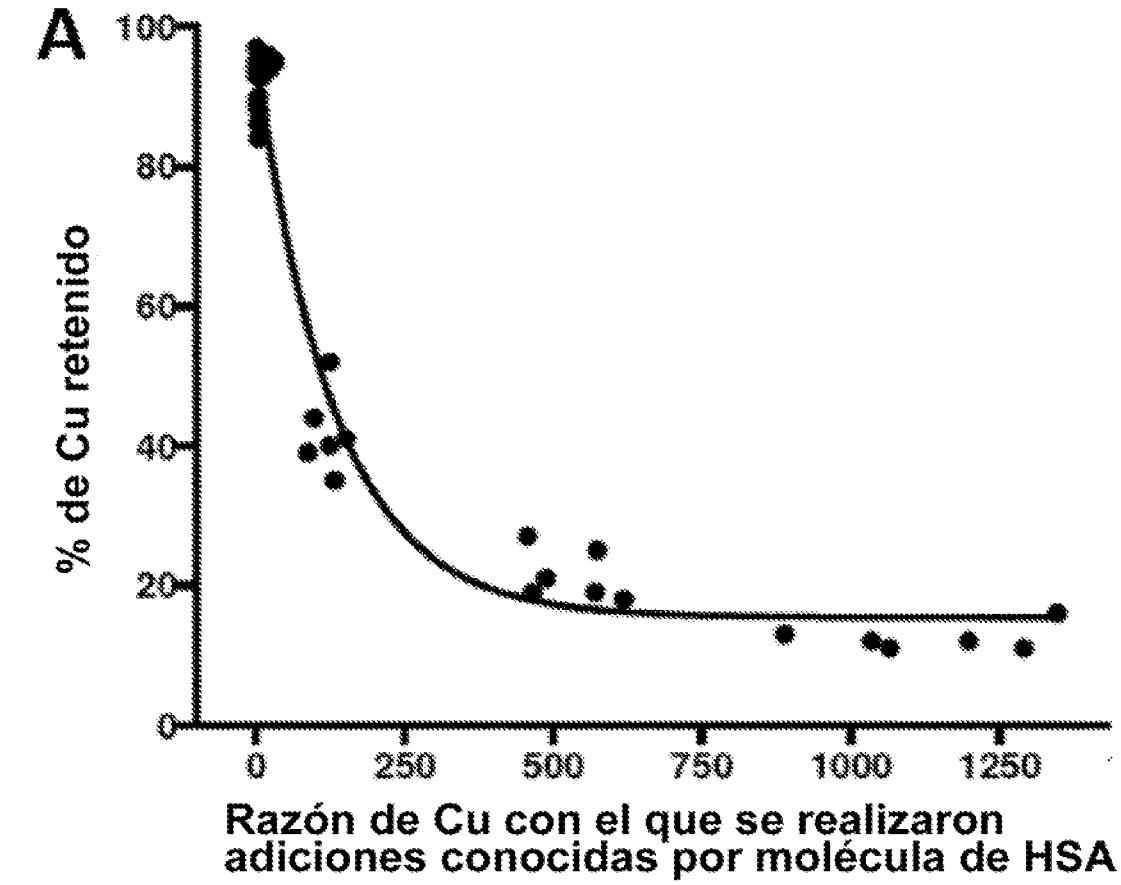
3. Método según la reivindicación 1 que comprende las etapas de i) proporcionar una muestra de suero que se ha obtenido del sujeto, ii) exponer la muestra de suero a una cantidad predeterminada de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina durante un tiempo suficiente para permitir que la albúmina sérica se una a dicho oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina, iii) medir la cantidad del oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina libres en la muestra de suero, y iv) calcular opcionalmente una razón entre la cantidad libre y la concentración de la albúmina sérica.

4. Método según la reivindicación 1, en el que las capacidades de unión se determinan mediante espectrometría de masas, en particular mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-EM).

5. Método según la reivindicación 3, en el que se determina una puntuación que está compuesta por las capacidades de unión medidas y se compara con un valor de referencia en el que una diferencia entre dicha puntuación y dicho valor de referencia indica si el sujeto padece una disfunción hepática.

6. Método según la reivindicación 3 que comprende el uso de un algoritmo de clasificación.

7. Método según la reivindicación 6 que comprende a) medir las capacidades de unión de oro (Au), cobre (Cu), cadmio (Cd), L-tiroxina y dansilsarcosina; b) implementar un algoritmo de clasificación en datos que comprenden las capacidades de unión medidas para obtener una salida de algoritmo; c) determinar la probabilidad de que el sujeto padezca una disfunción hepática.



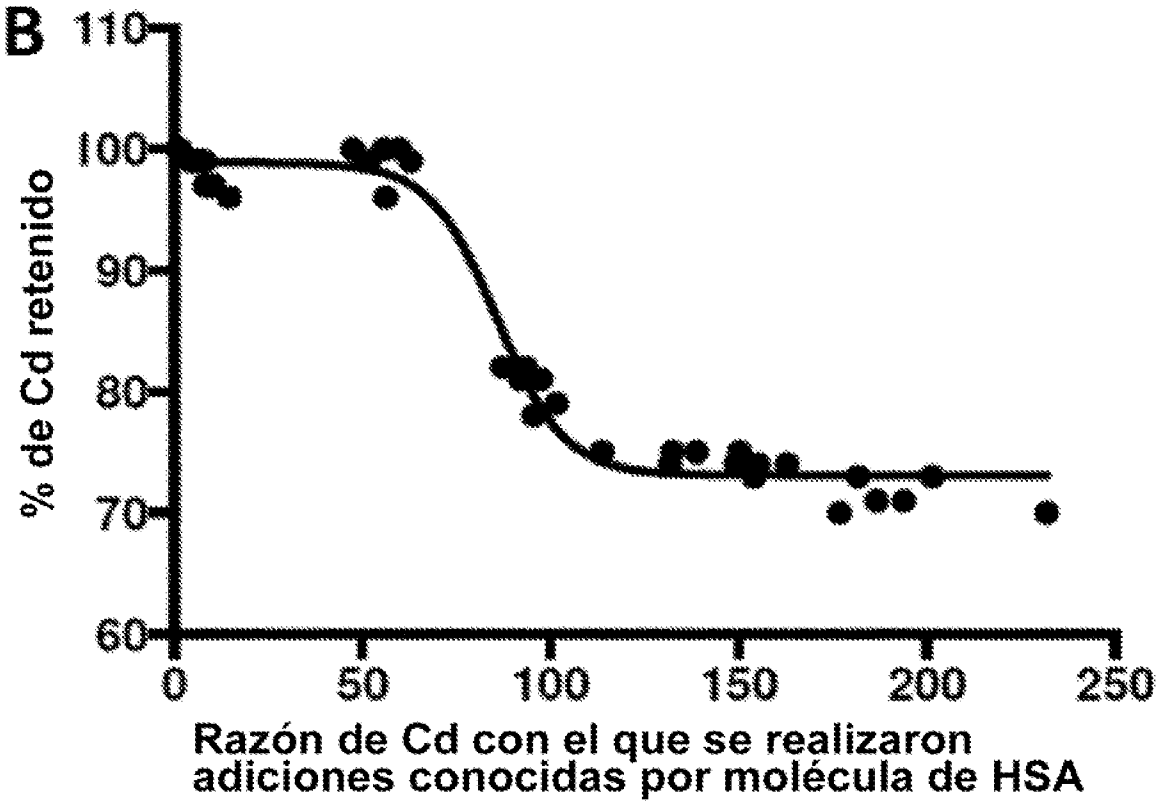
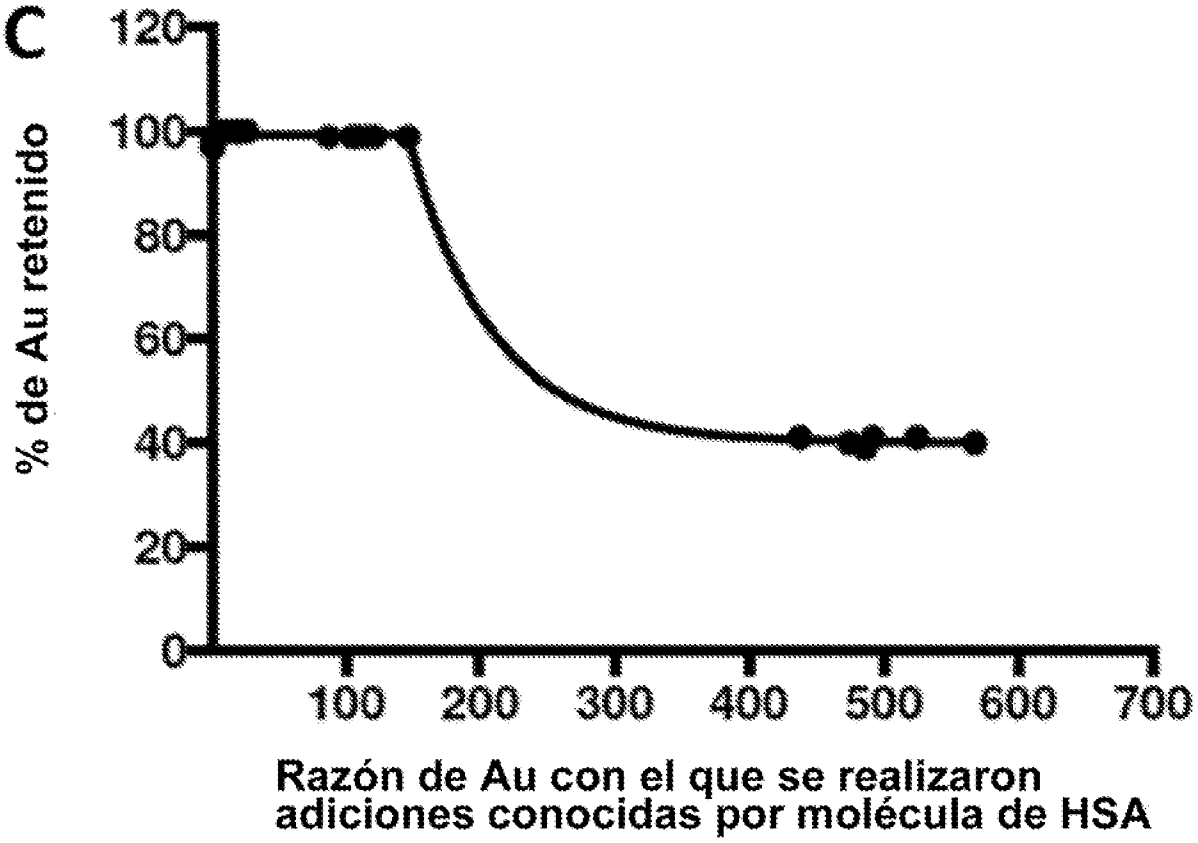


Figura 1A y 1B



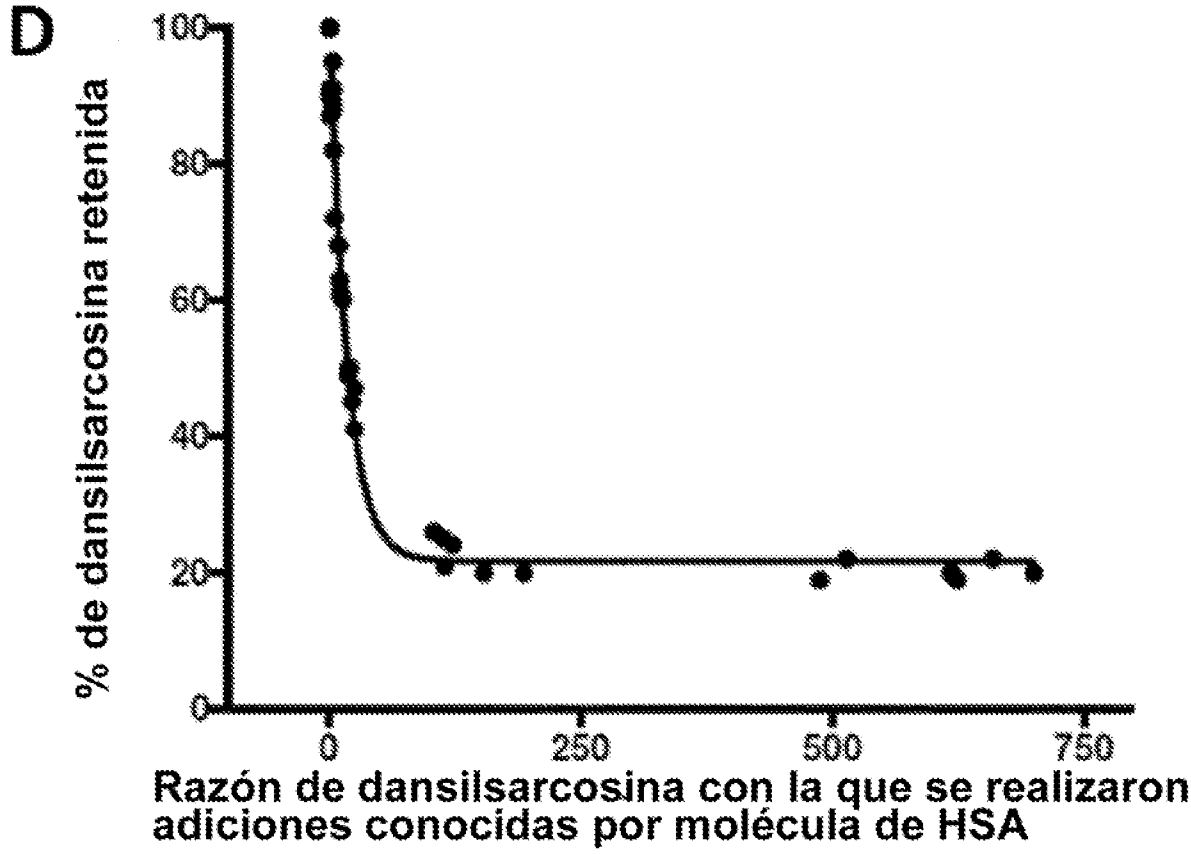


Figura 1C y 1D

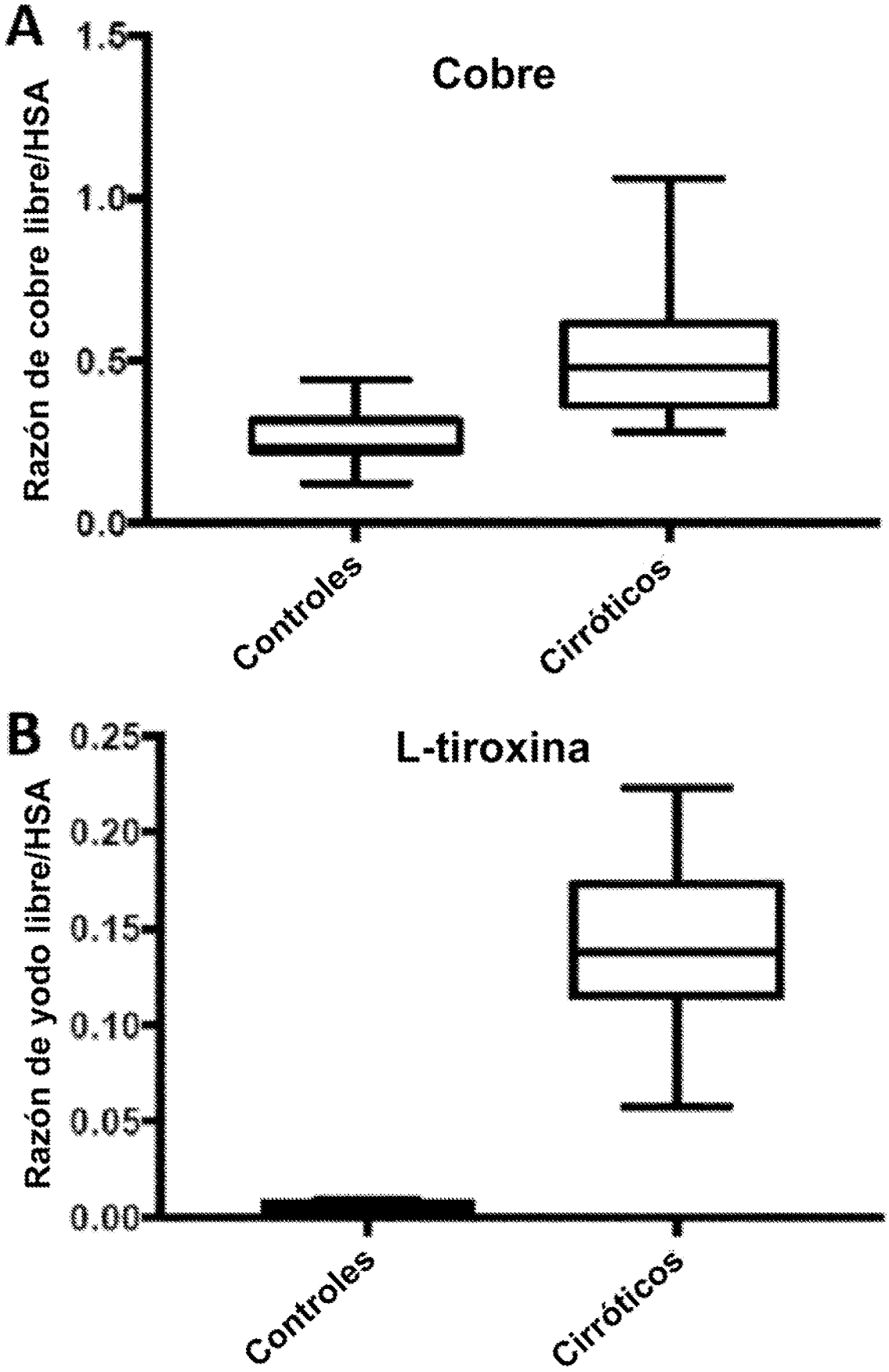


Figura 2A y 2B

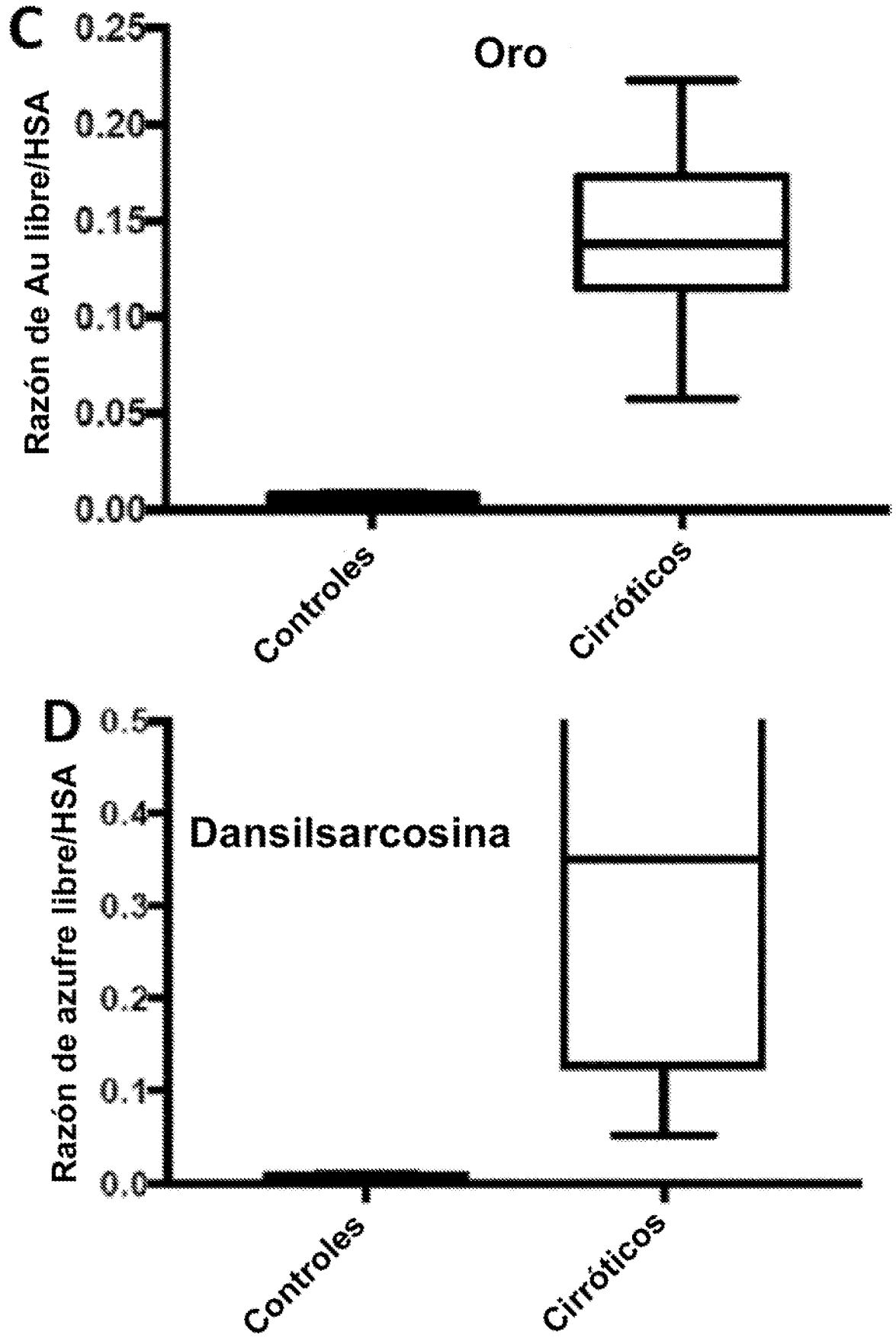


Figura 2C y 2D

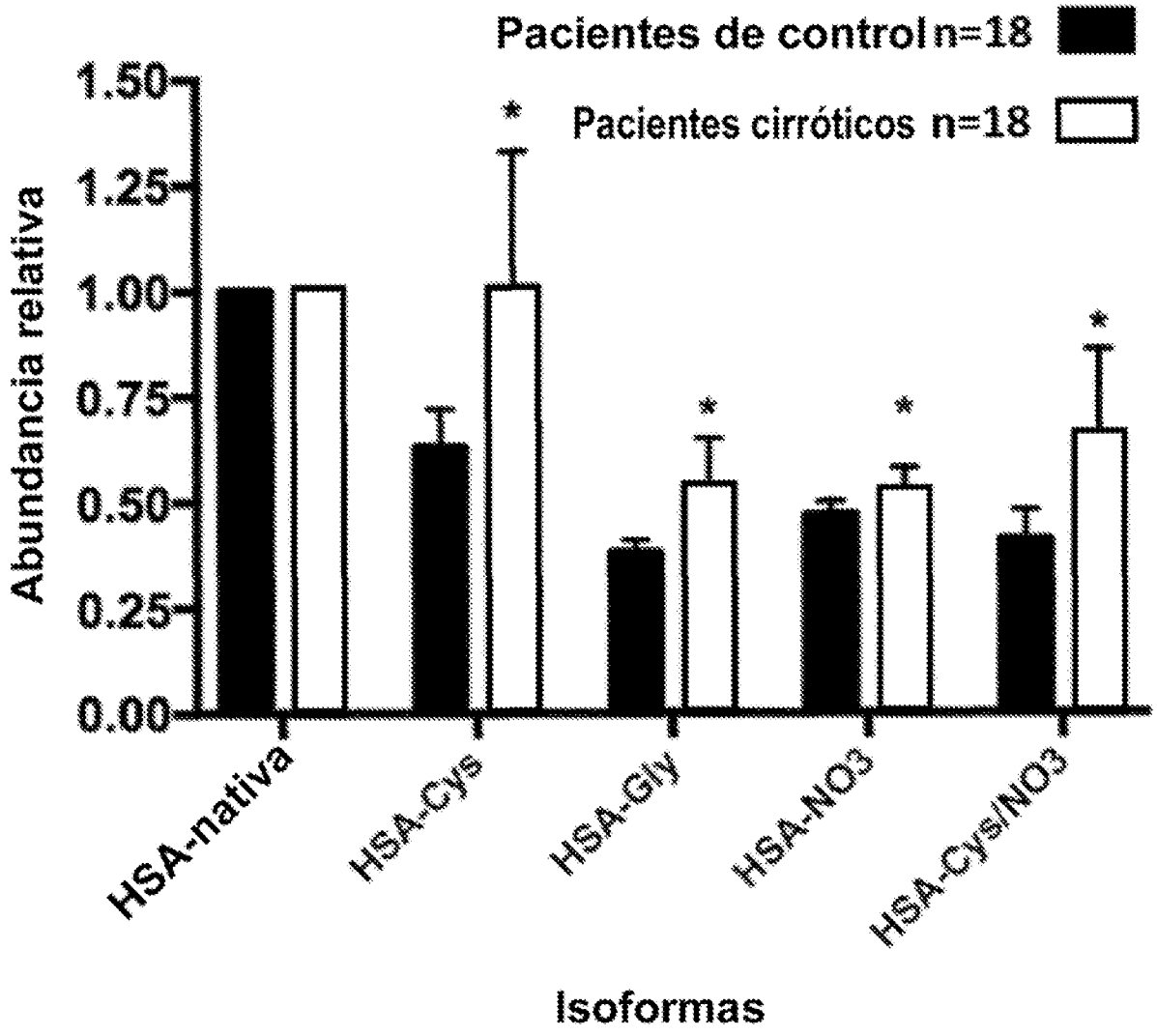

Pacientes de control n=18
Pacientes cirróticos n=18
Abundancia relativa
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
HSA-nativa
HSA-Cys
HSA-Gly
HSA-NO3
HSA-Cys/NO3
Isoformas

Figura 3

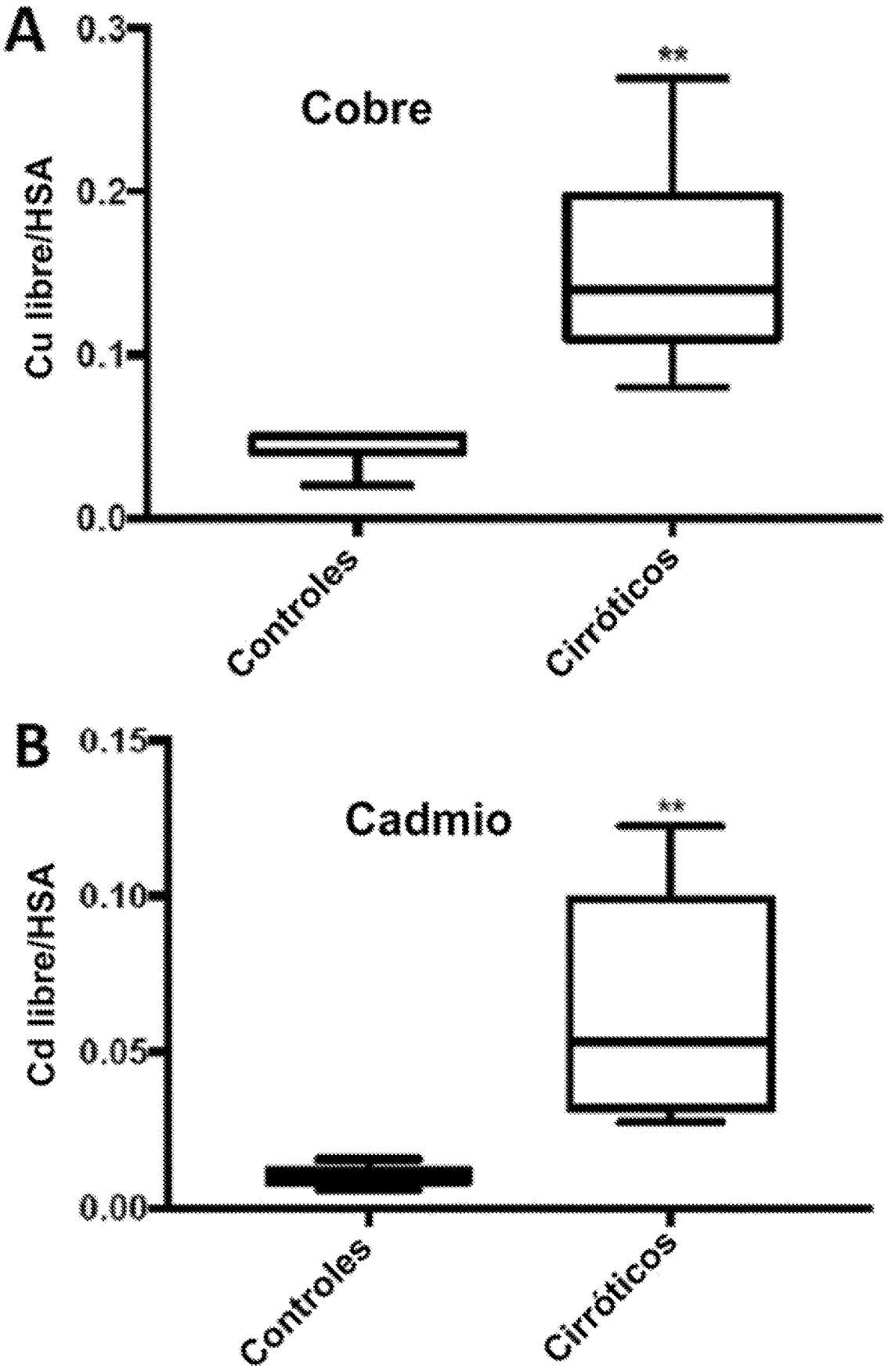


Figura 4A y 4B

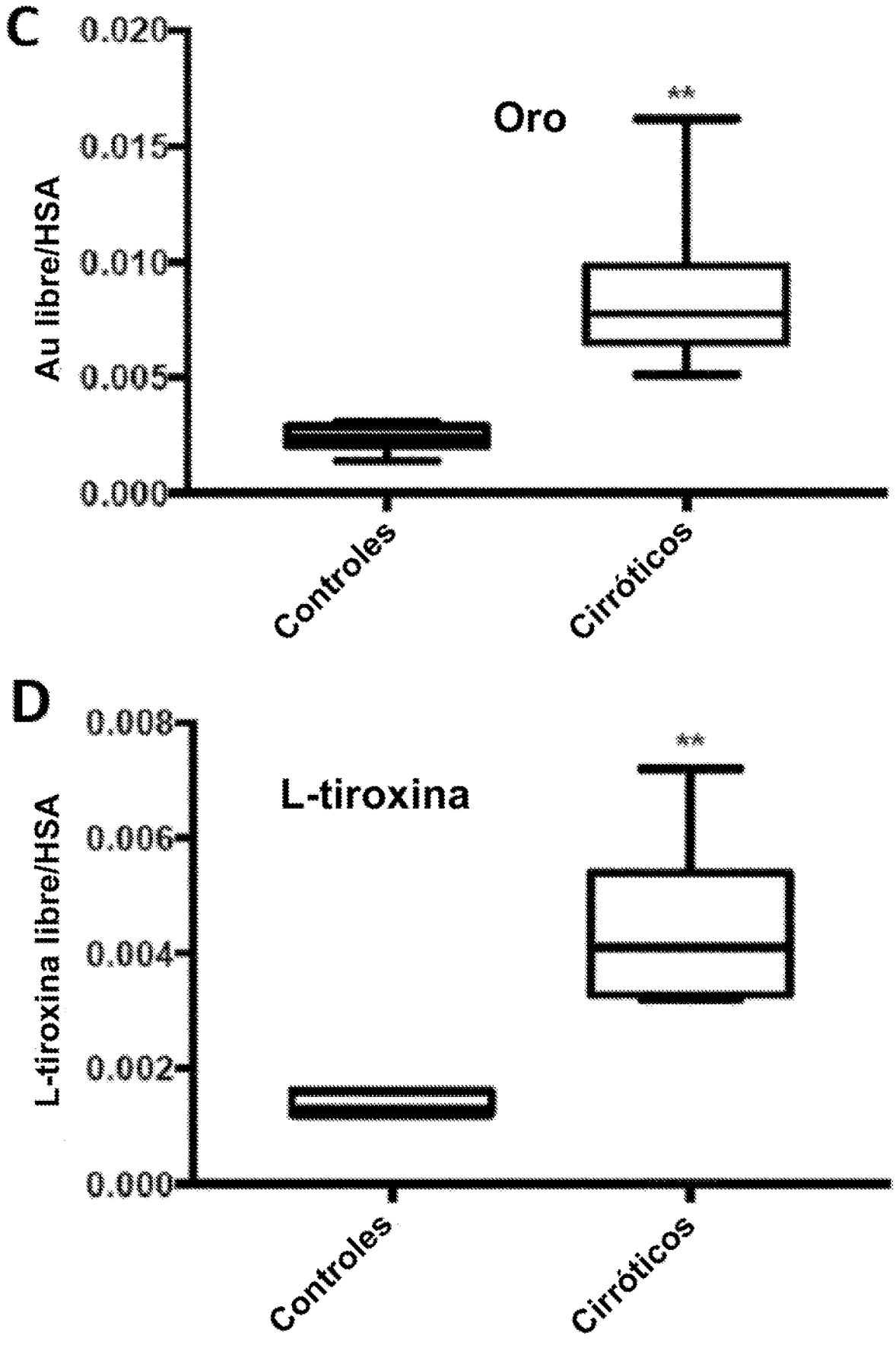


Figura 4C y 4D

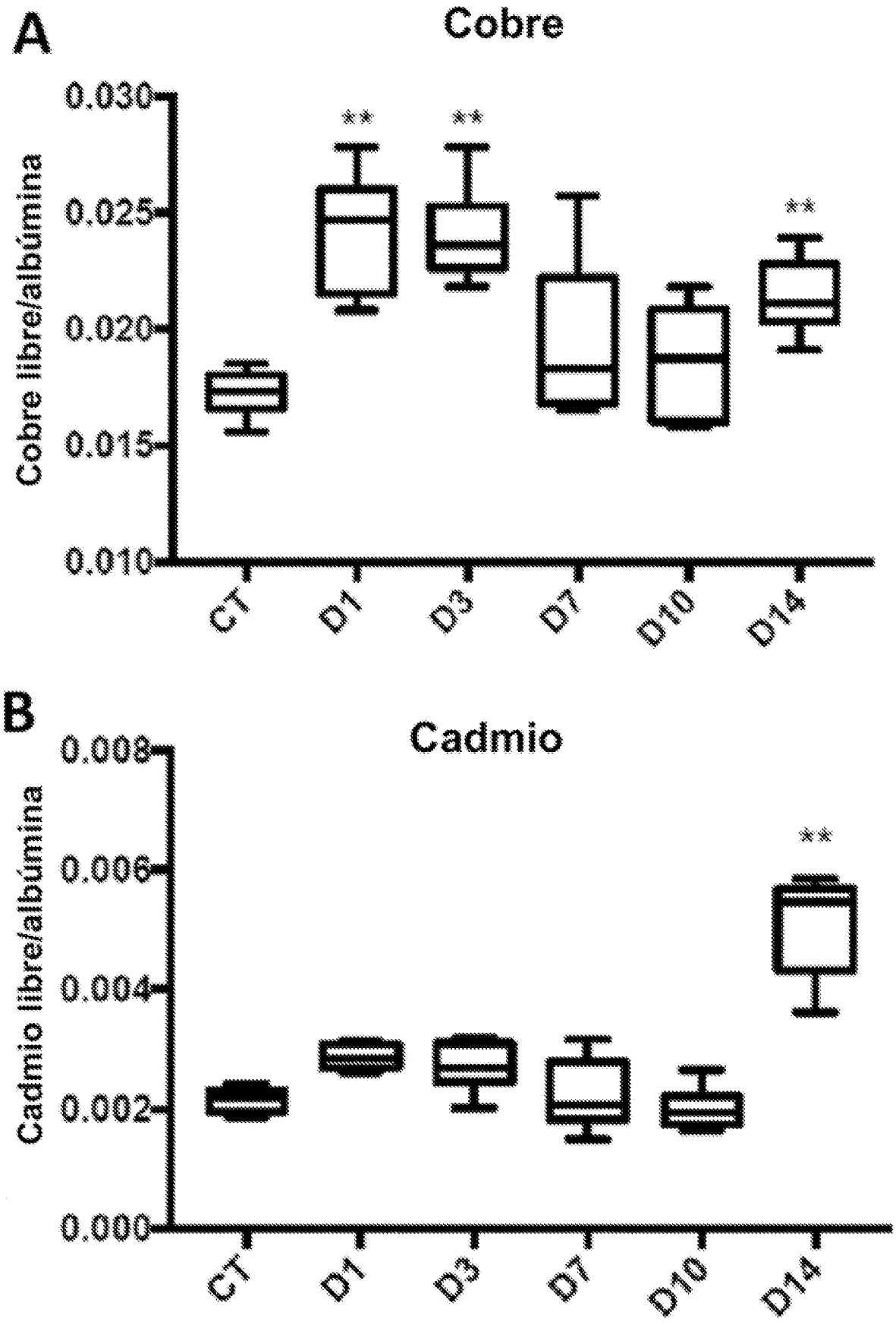


Figura 5A y 5B

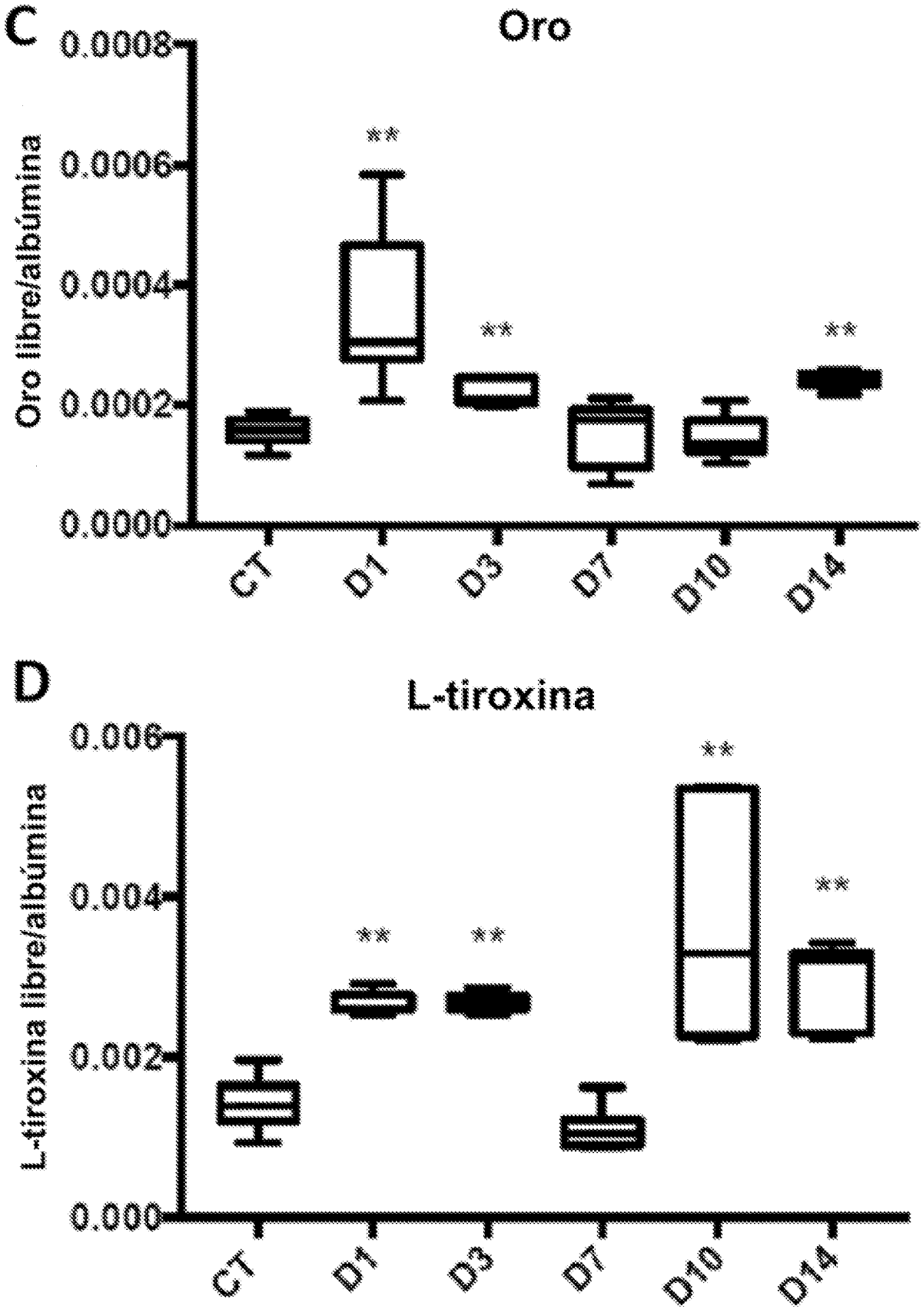


Figura 5C y 5D

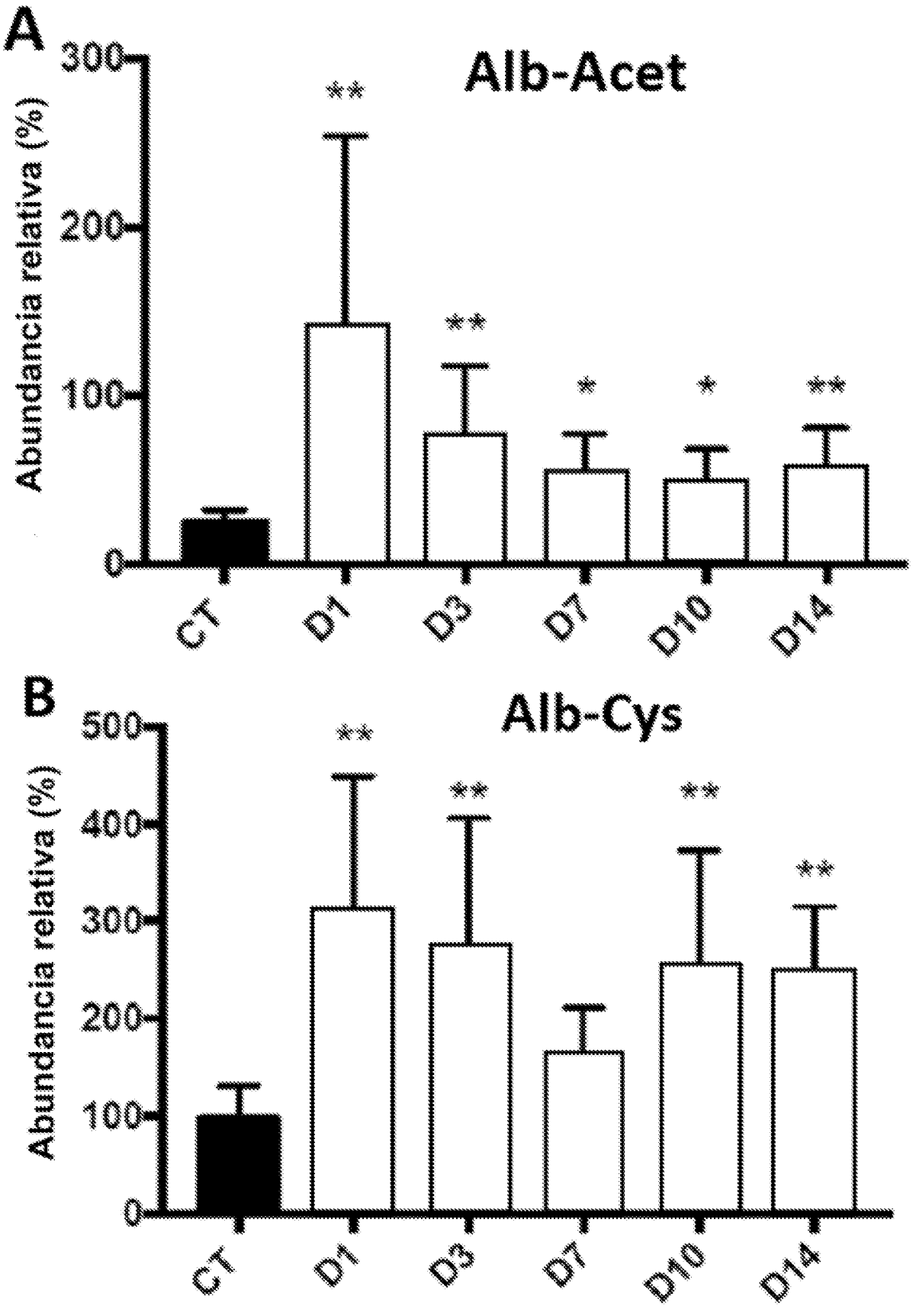


Figura 6A y 6B

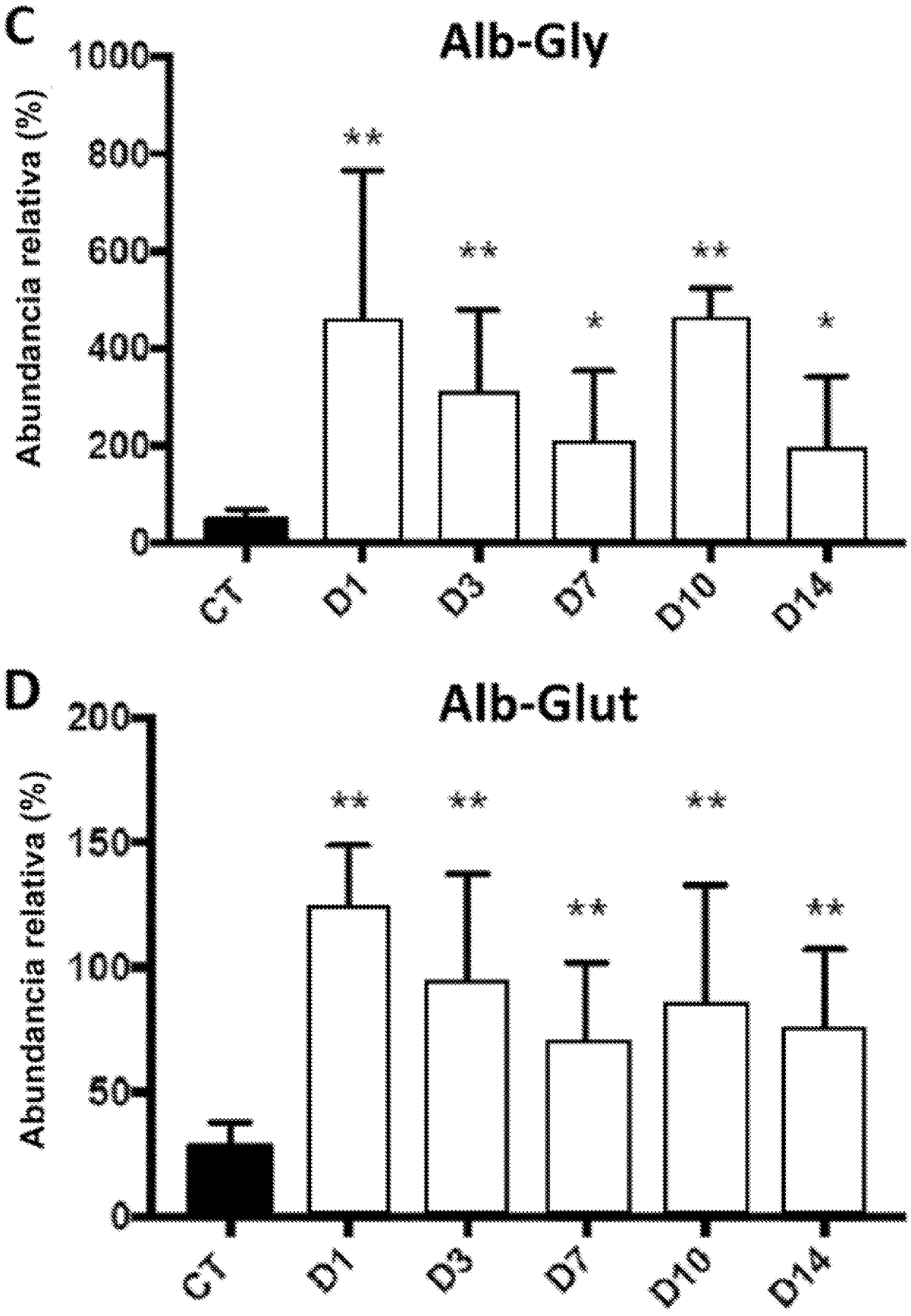


Figura 6C y 6D

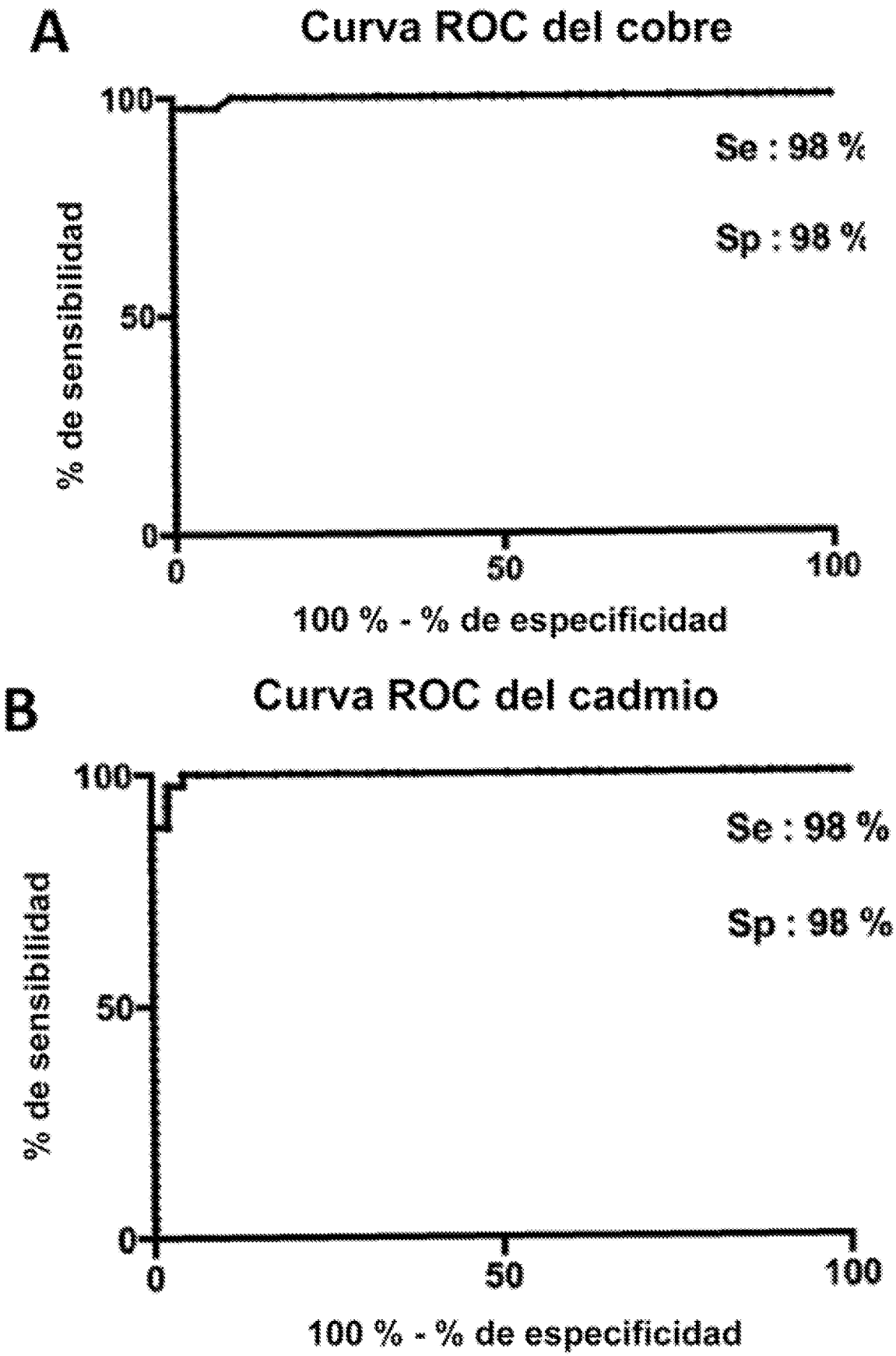
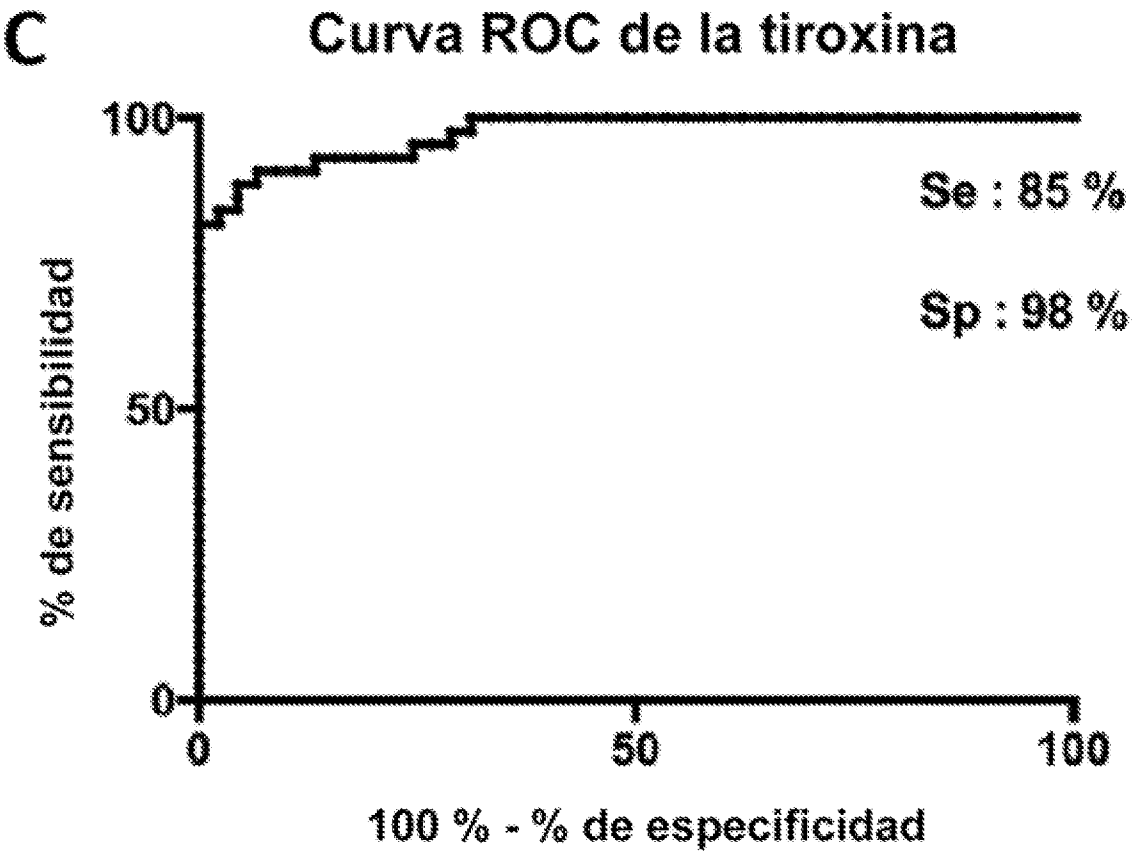


Figura 7A y 7B



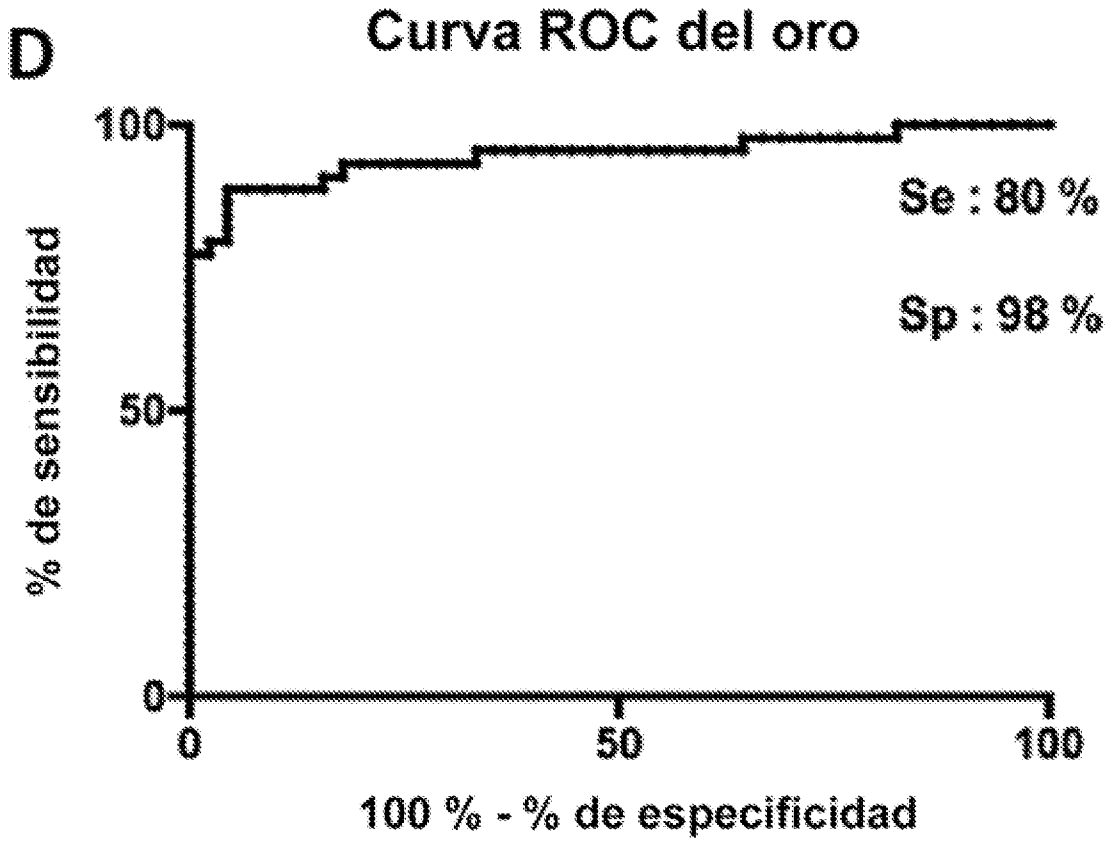


Figura 7C y 7D

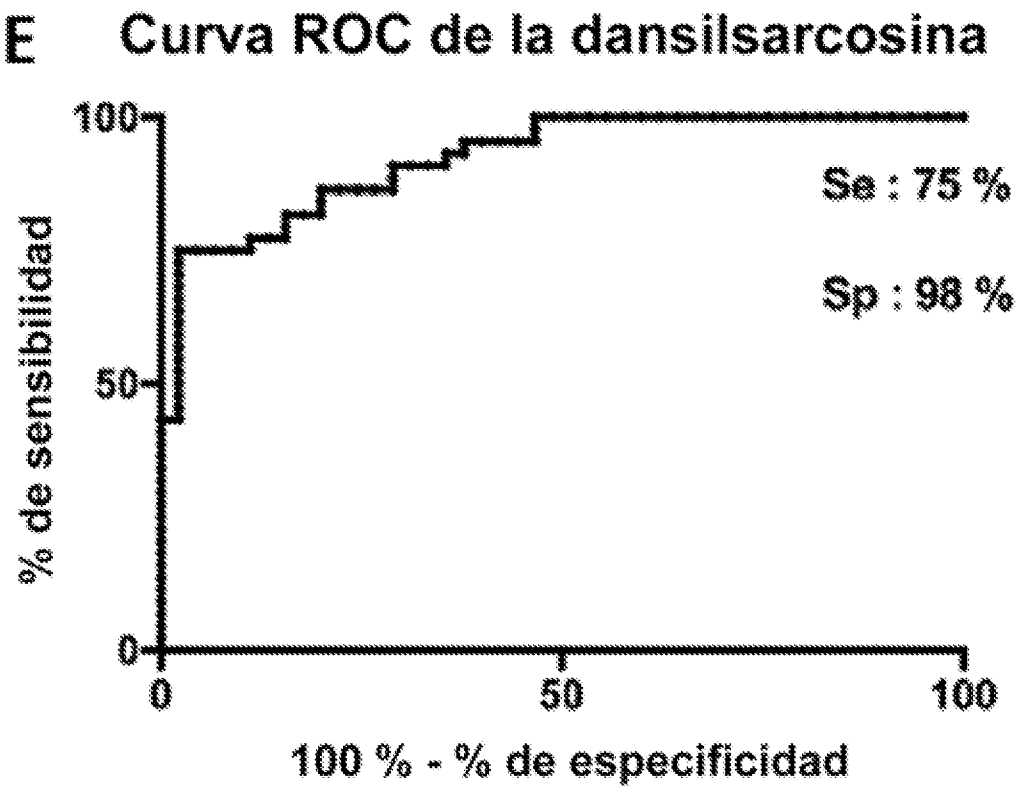


Figura 7E

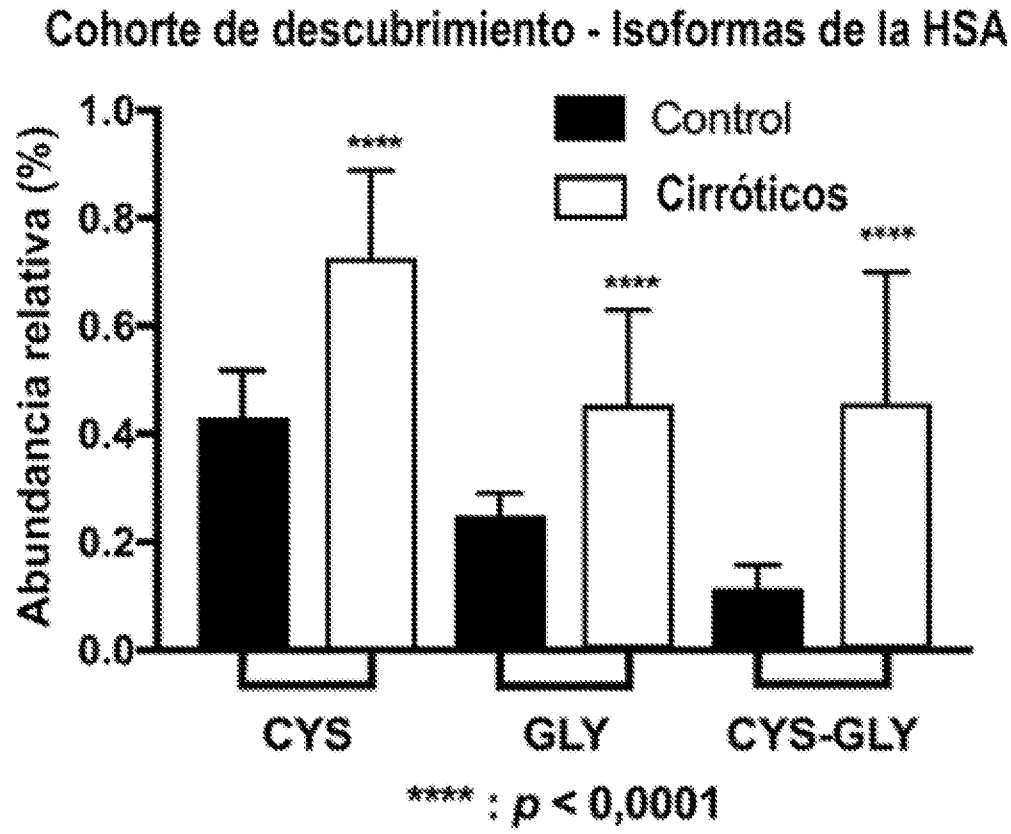


Figura 8