

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 647**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

A61P 1/16 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2018** **PCT/US2018/060106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2019** **WO19094777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2018** **E 18808196 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3710599**

54 Título: **Método de estadificación de la fibrosis hepática en pacientes con EHNA**

30 Prioridad:

13.11.2017 US 201762585421 P
01.10.2018 US 201862739778 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.11.2024

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

BILLIN, ANDREW, NICHOLAS;
CHUANG, JEN-CHIEH y
XU, REN, Y.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 986 647 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de estadificación de la fibrosis hepática en pacientes con EHNA

5 ANTECEDENTES

[0001] La EHNA constituye una importante necesidad médica no cubierta que va en aumento y que actualmente no cuenta con ninguna terapia aprobada. Se calcula que 16 millones de adultos estadounidenses padecen EHNA. Aproximadamente el 25 % de los pacientes diagnosticados con EHNA presentan fibrosis hepática avanzada, que se asocia con un aumento de la morbilidad y la mortalidad.

[0002] La biopsia se considera un procedimiento estándar para evaluar la salud del hígado, incluida la EHNA. No obstante, la biopsia es una técnica invasiva que no resulta ideal para numerosos pacientes. Los métodos no invasivos pueden proporcionar ventajas para diagnosticar, monitorizar o predecir la EHNA. En el presente documento se describen diversos marcadores no invasivos asociados con la EHNA o una presentación relacionada.

[0003] El documento WO 2012/105590 A1 desvela un marcador de determinación que comprende a YKL-40 y que puede usarse para distinguir entre la esteatosis simple y la EHNA en un paciente con enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). El documento WO 2005/039397 A2 desvela un método para diagnosticar la presencia o la gravedad de la fibrosis tisular en un individuo detectando α 2-macroglobulina (α 2-MG) en una muestra del individuo, detectando ácido hialurónico (AH) en una muestra del individuo, detectando inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) en una muestra del individuo y diagnosticando la presencia o la gravedad de la fibrosis tisular en el individuo basándose en la presencia o el nivel de α 2-MG, AH y TIMP-1. El documento WO 2017/139254 A1 desvela diversos métodos, composiciones y kits para determinar si un sujeto tiene EHGNA, y también desvela diversos métodos, composiciones y kits para determinar si un sujeto tiene EHNA. El documento WO 2017/167934 A1 desvela un método para diagnosticar la EHNA y para clasificar a un sujeto como receptor potencial de un tratamiento para la EHNA.

RESUMEN

[0004] La invención se especifica en las reivindicaciones anexas. La presente divulgación se basa en la evaluación de marcadores de proteínas y ácidos biliares, cuyos niveles se correlacionan con el estadio, el estado o el resultado del tratamiento de enfermedades o afecciones hepáticas. En una realización, se proporciona un método para clasificar a un paciente con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con fibrosis grave, que incluye medir los niveles proteicos de colectina renal 1 (CL-K1), espondina-1 (RSPO1), metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), componente del complemento 7 (C7), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y trombospondina-2 (TSP2) en una muestra de suero aislada del paciente con EHNA; determinar si el estadio de fibrosis hepática de la Red de Investigación Clínica (CRN) de la esteatohepatitis no alcohólica en el paciente con EHNA es un estadio 3 o 4 basándose en los niveles proteicos medidos y en diversos valores de referencia predeterminados, de manera que los valores de referencia predeterminados incluyen los niveles proteicos de referencia para la colectina renal 1 (CL-K1), la espondina-1 (RSPO1), la metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), el componente del complemento 7 (C7), la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), la subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y la trombospondina-2 (TSP2) en los estadios de fibrosis de la CRN de 0 a 4; y clasificar al paciente con EHNA con fibrosis grave si el estadio de fibrosis de la CRN determinado es 3 o 4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[0005]

La **Figura 1** (FIG. 1) muestra diversas proteínas cuyos niveles de expresión en el suero se correlacionan de manera significativa con la gravedad de la enfermedad de EHNA.

La **Figura 2** es un diagrama de Venn que muestra los solapamientos entre el estadio de la fibrosis y los componentes de la EHNA para los marcadores proteicos.

La **Figura 3** muestra que la capacidad de diagnóstico del estadio de la fibrosis en el punto de referencia usando biomarcadores combinados aumenta en comparación con los mejores marcadores individuales.

Las **Figuras 4-7** muestran el rendimiento de los marcadores proteicos multivariantes para monitorizar la mejora de los parámetros clínicos, el estadio de fibrosis de la CRN (Figura 4), la esteatosis (Figura 5), la inflamación lobulillar (Figura 6) y el abombamiento hepático (Figura 7).

La **Figura 8** (no conforme a la invención) muestra un gráfico que muestra que los perfiles de ácidos biliares en el suero están alterados de manera significativa en sujetos con EHNA con diferentes estadios de fibrosis.

La **Figura 9** (no conforme a la invención) muestra que los niveles de C4 sérico (7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona) aumentan en los sujetos con EHNA de F2/F3, pero disminuyen en los sujetos de F4 y los sujetos descompensados. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

La **Figura 10** muestra el potencial único y solapado secretado/filtrado de múltiples bases de datos.

Figura 11. Flujo de trabajo del secretoma de la EHNA.

Figura 12. Diagnóstico de fibrosis grave o cirrosis usando los niveles de ARN hepático de los principales secretomas candidatos combinados e individuales.

Figura 13. Los secretomas candidatos demostraron una asociación significativa entre los niveles de proteínas circulantes y la fibrosis hepática en 1497 muestras y muestras de estudio sim (F2-4).

Las **Figuras 14-15** (no conformes a la invención) muestran la correlación significativa entre las proteínas circulantes GDF-15 y determinados estadios y características de la EHNA.

Las **Figuras 16-18** (no conformes a la invención) muestran la correlación significativa entre las proteínas circulantes CD 163 y determinados estadios y características de la EHNA.

La **Figura 19** es un diagrama de Venn que muestra diversos marcadores de metabolitos superpuestos para diferentes fenotipos de EHNA.

[0006] Debe entenderse que algunas o la totalidad de las figuras son representaciones esquemáticas con fines ilustrativos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0007] A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona con conocimientos comunes en el campo al que pertenece la presente invención. Los títulos del presente documento se proporcionan únicamente por conveniencia y no implican limitación alguna.

[0008] A lo largo de la presente especificación, y a menos que el contexto indique lo contrario, debe entenderse que los términos «comprende», «comprenden» y «que comprende(n)» implican la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. La expresión «que consta de» incluye -y se limita a- lo que sigue a la expresión «que consta de». Así, la expresión «que consta de» indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. La expresión «que consta básicamente de» incluye cualquier elemento enumerado después de dicha expresión, y restringe el resto de elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o la acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Así, la frase «que consta básicamente de» indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que los demás elementos son opcionales y que pueden estar presentes -o no- dependiendo de si afectan o no a la actividad o la acción de los elementos enumerados.

[0009] A lo largo de la presente especificación, la referencia a «algunas realizaciones», «una realización», «otra realización», «una realización particular», «una realización relacionada», «una realización determinada», «una realización adicional» u «otra realización adicional» -o combinaciones de las mismas- indica que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por consiguiente, las diferentes apariciones de las frases anteriores en diversos lugares a lo largo de la presente especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Asimismo, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

[0010] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "muestra" se refiere de manera general a un fluido de un ser humano. Los ejemplos no limitativos de una muestra incluyen los siguientes: bilis, sangre, plasma sanguíneo, suero, leche materna, heces, pus, saliva, sebo, semen, sudor, lágrimas, orina y vómito. En algunas realizaciones, la muestra es suero.

[0011] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero. Los sujetos ejemplares incluyen -pero no se limitan a- humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cabras y ovejas. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad o afección hepática y puede ser tratado tal y como se describe en el presente documento.

[0012] Tal y como se utiliza en el presente documento, cuando se hace referencia a un paciente, el término "sospechoso" se refiere a la posibilidad de que un paciente tenga una determinada enfermedad o afección hepática basándose en una correlación.

[0013] Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" u otro léxico similar se refieren a un proceso para (1) retrasar la aparición de una enfermedad que está causando síntomas clínicos; (2) inhibir una enfermedad, es decir, detener el desarrollo de los síntomas clínicos; y/o (3) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de los síntomas clínicos o de la gravedad de los mismos.

[0014] Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "enfermedad o afección hepática" se refiere a

una o más de las siguientes: fibrosis hepática, hepatitis alcohólica, esteatohepatitis C7 (EHNA), enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) o inflamación del hígado.

[0015] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "NAS" hace referencia a la puntuación de actividad de la EHGNA, que es un sistema de puntuación para la EHGNA.

Identificación y tratamiento de las afecciones o enfermedades hepáticas

[0016] Los ejemplos experimentales de la presente divulgación identificaron diversos marcadores no invasivos a partir de muestras de suero que pueden usarse para diagnosticar enfermedades o afecciones hepáticas, como la fibrosis hepática, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) y la inflamación hepática. Más concretamente, los autores de la presente invención demostraron que los niveles de expresión de determinados marcadores proteicos, individualmente o en combinación, se correlacionaban de manera significativa con el estadio o estado de la enfermedad o afección hepática. Además, los niveles de C4 sérico (7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona), que se midieron para mostrar la biosíntesis de ácidos biliares hepáticos, se correlacionaban con los estadios de fibrosis y el desarrollo de cirrosis.

[0017] Debe entenderse que la información obtenida mediante los ensayos de diagnóstico descritos en el presente documento puede usarse sola o en combinación con otra información, como, por ejemplo, los genotipos o niveles de expresión de otras proteínas, los parámetros químicos clínicos, los parámetros histopatológicos, o la edad, el sexo y el peso del sujeto. Cuando se usa sola, la información obtenida mediante los ensayos diagnósticos aquí descritos resulta útil para determinar o identificar el resultado clínico de un tratamiento, seleccionar a un paciente para un tratamiento, o tratar a un paciente, etc. Por otro lado, cuando se usa en combinación con otra información, la información obtenida mediante los ensayos de diagnóstico descritos en el presente documento resulta útil para ayudar a determinar o identificar el resultado clínico de un tratamiento, ayudar a seleccionar a un paciente para un tratamiento o ayudar a tratar a un paciente, etc. En un aspecto particular, los genotipos o niveles de expresión de una o más proteínas tal y como se desvelan en el presente documento se usan en un panel de proteínas, de manera que cada uno de ellos contribuye al diagnóstico, el pronóstico o el tratamiento final.

[0018] También se han identificado marcadores proteicos que se correlacionan con las mejoras clínicas posteriores a un tratamiento. Por consiguiente, estos marcadores pueden usarse para monitorizar el tratamiento de los pacientes. Por ejemplo, cuando los marcadores muestran que un tratamiento ha sido eficaz en un paciente, se le puede indicar al paciente que continúe con el tratamiento. Por el contrario, si los marcadores muestran que no se han obtenido las mejoras deseadas con el tratamiento, se puede utilizar un nuevo tratamiento (por ejemplo, un nuevo medicamento o una dosis más alta).

[0019] Por consiguiente, de acuerdo con la invención, se proporciona un método para determinar el estadio o estado de una enfermedad o afección hepática en un sujeto humano, por ejemplo uno que se sospecha que tiene una enfermedad o afección hepática. El método incluye medir los niveles de expresión de diversas proteínas/genes, seleccionados de la Tabla 1A, presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano y determinar el estadio de fibrosis hepática en el sujeto humano basándose en los niveles de expresión. Más específicamente, la invención proporciona un método para clasificar a un paciente con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con fibrosis grave, que incluye medir los niveles proteicos de la colectina renal 1 (CL-K1), la espondina-1 (RSPO1), la metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), el componente del complemento 7 (C7), la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), la subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y la trombospondina-2 (TSP2) en una muestra de suero aislada del paciente con EHNA; determinar si el estadio de fibrosis hepática de la Red de Investigación Clínica (CRN) de la esteatohepatitis no alcohólica en el paciente con EHNA es un estadio 3 o 4 basándose en los niveles proteicos medidos y en diversos valores de referencia predeterminados, de manera que los valores de referencia predeterminados incluyen los niveles proteicos de referencia para la colectina renal 1 (CL-K1), la espondina-1 (RSPO1), la metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), el componente del complemento 7 (C7), la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), la subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y la trombospondina-2 (TSP2) en los estadios de fibrosis de la CRN de 0 a 4; y clasificar al paciente con EHNA con fibrosis grave si el estadio de fibrosis de la CRN determinado es 3 o 4. La determinación incluye comparar los niveles proteicos medidos con los niveles de referencia. En algunas realizaciones, los niveles de referencia se obtienen de un sujeto humano que no padece fibrosis hepática.

[0020] Por ejemplo, la Tabla 1A muestra que el marcador proteico "colectina renal 1" tiene los niveles de expresión 5987.2, 4903.3, 8174.95, 11267.55 y 15604.5 (unidad: unidad fluorescente relativa [RFU]) en los estadios de fibrosis de la CRN 0-4, respectivamente, en la muestra de prueba. Cuando se evalúa a un nuevo sujeto y el nivel de expresión de la colectina renal 1 es de 11000 (RFU, normalizada), se puede determinar que este nuevo sujeto probablemente tiene una fibrosis hepática en el estadio de fibrosis 3 de la CRN.

[0021] En la presente invención, las proteínas se seleccionan de la Tabla 1A o la Tabla 2A. En este aspecto, la variable de diagnóstico es un estadio de fibrosis de la CRN. En otras divulgaciones que no forman parte de la presente invención, las proteínas se seleccionan de la Tabla 1B o 2B, y la variable de diagnóstico es un estadio de

fibrosis de Ishak; las proteínas se seleccionan de la Tabla 1C o 2C, y la variable de diagnóstico es una puntuación NAS; las proteínas se seleccionan de la Tabla 1D o 2D, y la variable de diagnóstico es una esteatosis; las proteínas se seleccionan de la Tabla 1E o 2E, y la variable de diagnóstico es una inflamación lobular (LI); o las proteínas se seleccionan de la Tabla 1F o 2F, y la variable de diagnóstico es un abombamiento hepático (HB).

[0022] En las tablas se puede observar que algunos marcadores proteicos están asociados con múltiples variables de diagnóstico, mientras que algunos son exclusivos de una variable en particular (ver el resumen de la Tabla A). Por ejemplo, 6Ckina, BSSP4, IL-8, LIF sR, LTBP4, MIC-1, SAP, SEM6B, SLAF7 y espondina-1 son exclusivos de la fibrosis de la CRN y HSP 70 es común a los cinco parámetros de la Tabla 5. Por consiguiente, un nivel de expresión adecuado de 6Ckina puede indicar un estadio de fibrosis de CRN particular, mientras que un nivel de expresión adecuado de HSP 70 implica un estadio o estado particular para las cinco variables.

[0023] Tal y como se muestra en el análisis multivariante del Ejemplo 1, cuando se usan de manera combinada, un grupo de siete marcadores proteicos tienen una capacidad de diagnóstico incluso mayor. Estos siete marcadores proteicos incluyen a C7 (Componente del complemento 7), CL-K1 (Colectina renal 1), IGFBP7 (Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7), Espondina 1 (RSP01), IL-5Ra (UniProt: Q01344; Subunidad alfa del receptor de interleucina 5), MMP-7 (Metalopeptidasa de matriz 7) y TSP2 (Trombospondina-2). En la invención se utilizan los siete marcadores.

[0024] Tal y como se demuestra en el Ejemplo 2 (no conforme a la invención), los niveles séricos de C4 (7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona) también se correlacionan con el estadio y el estado de las enfermedades hepáticas, de manera que pueden usarse individualmente o en combinación con otros marcadores como los desvelados en el presente documento- para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades o afecciones hepáticas.

[0025] De manera adicional o independiente, la evaluación de la enfermedad puede realizarse con información obtenida a través de métodos convencionales o no convencionales. En una divulgación, se proporciona un método (no conforme a la invención) para identificar a un paciente con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) como probable paciente con fibrosis avanzada. El método incluye medir el nivel de AST, el nivel de ALT y el recuento de plaquetas para el paciente con EHNA y calcular un índice de fibrosis-4 (FIB-4), medir las concentraciones séricas del inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1), el péptido amino-terminal de procógeno tipo III (PIIINP) y el ácido hialurónico (HA) para el paciente con EHNA y calcular una puntuación de fibrosis hepática mejorada (ELF), o realizar una elastografía transitoria (Fibroscan) del paciente con EHNA para determinar una puntuación de Fibroscan, y comparar el índice FIB-4 y uno o ambos de entre la puntuación ELF y la puntuación de Fibroscan con los valores de referencia, e identificar al paciente con EHNA como probable paciente con fibrosis avanzada basándose en la comparación.

[0026] En algunas divulgaciones, se determinan el índice FIB-4 y la puntuación ELF. En algunas divulgaciones, se determinan el índice FIB-4, la puntuación ELF y la puntuación Fibroscan. En algunas divulgaciones, no se realizan mediciones invasivas al paciente con EHNA. En una divulgación, se realiza una evaluación de la puntuación FIB-4 o la puntuación ELF y se trata a un paciente con uno o más agentes terapéuticos seleccionados de entre un inhibidor de ASK1, un inhibidor de ACC o un agonista de FXR. En una divulgación, se realiza una evaluación de la puntuación FIB-4 o la puntuación ELF y se trata a un paciente con selonsertib.

[0027] Como se demuestra en el Ejemplo 6 (no conforme a la invención), los metabolitos medidos en muestras de suero de un individuo también pueden usarse como biomarcadores para evaluar las etapas de la enfermedad. Por consiguiente, la presente divulgación desvela un método para determinar el estadio o el estado de la enfermedad o afección hepática en un sujeto humano, por ejemplo uno que se sospecha que tiene una enfermedad o afección hepática. El método incluye medir los niveles de uno o más metabolitos (seleccionados de las Tablas 15-27) presentes en una muestra biológica (por ejemplo, suero) obtenida del sujeto humano y determinar el estadio de fibrosis hepática en el sujeto humano en función de dichos niveles. En algunas divulgaciones, la determinación incluye comparar los niveles con los niveles de referencia. En algunas divulgaciones, los niveles de referencia se obtienen de un sujeto humano que no padece fibrosis hepática.

[0028] En algunas divulgaciones, los metabolitos se seleccionan de la Tabla 15. En este aspecto, la variable de diagnóstico es un estadio de fibrosis de CRN. En otras divulgaciones que no forman parte de la presente invención, los metabolitos se seleccionan de la Tabla 16, y la variable de diagnóstico es una puntuación NAS; los metabolitos se seleccionan de la Tabla 17, y la variable de diagnóstico es una esteatosis; los metabolitos se seleccionan de la Tabla 19, y la variable de diagnóstico es una inflamación lobular (LI); o los metabolitos se seleccionan de la Tabla 18, y la variable de diagnóstico es un abombamiento hepático (HB).

[0029] En algunas realizaciones, la determinación de una enfermedad o afección hepática en un paciente es seguida por un tratamiento, tal y como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la determinación de una enfermedad o afección hepática se lleva a cabo durante el tratamiento.

[0030] Tal y como se demuestra en el Ejemplo 6 y en la Figura 19, los diferentes paneles de biomarcadores

pueden diferenciar a pacientes con diferentes presentaciones de la enfermedad. En una divulgación, un panel de biomarcadores como el descrito en el Ejemplo 6 puede usarse para distinguir a pacientes con las siguientes presentaciones: F0-2 versus F3-4, NAS $\geq$ 5 versus NAS $<$ 5, cirróticos criptogénicos versus cirróticos no criptogénicos, y pacientes F4 versus pacientes F0-3. Una vez que se determina la presentación de un paciente a partir de la obtención de una muestra biológica que incluye el panel descrito en el Ejemplo 6, el paciente puede tratarse con uno o más agentes terapéuticos, tal y como se describe en el presente documento.

Monitorización de las mejoras clínicas

[0031] Tal y como se muestra en el Ejemplo 1, se han identificado diversos marcadores proteicos que se correlacionan bien con la mejora de determinados criterios de valoración clínicos. Por consiguiente, estos marcadores proteicos pueden usarse para monitorizar la eficacia de un tratamiento en un paciente.

[0032] La presente divulgación también desvela un método para evaluar el efecto de un tratamiento en un paciente que padece una enfermedad o afección hepática y que ha recibido el tratamiento. En algunas realizaciones, el método incluye medir los niveles de expresión de una o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3A-D y 12) presentes en una muestra biológica aislada del paciente; y evaluar el efecto del tratamiento comparando los niveles de expresión con los niveles de expresión de referencia obtenidos de los pacientes antes del tratamiento.

[0033] Por ejemplo, para un paciente que tiene fibrosis hepática, si los niveles de KYNu bajan un 30 % después del tratamiento, es probable que el paciente esté respondiendo al tratamiento, ya que este cambio sugiere una mejora de la esteatosis. Por el contrario, si la disminución de los niveles de KYNu es solo de aproximadamente un 5%, es probable que este paciente no esté respondiendo al tratamiento y esté justificada una nueva opción de tratamiento (por ejemplo, un medicamento diferente, un tratamiento más prolongado o una dosis más alta).

[0034] Cada uno de los criterios de valoración clínicos/variables clínicas (esteatosis, inflamación lobular, abombamiento hepático y estadio de fibrosis de CRN) tiene la correspondiente lista de marcadores proteicos para monitorizar su mejora. Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora de la esteatosis, el marcador proteico se selecciona de la Tabla 3A, la Tabla 4A o la Tabla 12. Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora de la inflamación lobular, el marcador proteico se selecciona de la Tabla 3B, la Tabla 4B o la Tabla 12. Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora del abombamiento hepático, el marcador proteico se selecciona de la Tabla 3C, la Tabla 4C o la Tabla 12. Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora del estadio de fibrosis de CRN, el marcador proteico se selecciona de la Tabla 3D o la Tabla 4D.

[0035] También se identifican diversos grupos de marcadores multivariantes para cada criterio de valoración clínico, los cuales se resumen en la Tabla B. Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora del estadio de fibrosis de CRN, los marcadores proteicos son dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, o los siete marcadores proteicos seleccionados de entre pTEN (P60484), CD70 (P32970), Caspasa-2 (P42575), Cathepsina H (P09668), LAG-1 (Q8NHW4), PDXK (O00764) y GTR (Q9Y5U5).

[0036] Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora de la esteatosis, los marcadores proteicos son dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o más, o los doce marcadores proteicos seleccionados de entre Integrina α 1b1 (P56199, P05556), proteína similar a nectina 2 (Q9BY67), PDGF Rb (P09619), LRP8 (Q14114), Ligando CD30 (P32971), Lumican (P51884), SAP (P02743), YKL-40 (P36222), sTie-2 (Q02763), HSP 90a/b (P07900 P08238), TSP2 (P35442) y YES (P07947).

[0037] Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora de la inflamación lobular, los marcadores proteicos son dos, tres, cuatro, cinco o más, o los cinco marcadores proteicos seleccionados de entre HSP 90a/b (P07900 P08238), Aminoacilasa-1 (Q03154), FCG3B (075015), M-CSF R (P07333) y Queratina 18 (P05783).

[0038] Cuando el criterio de valoración clínico es la mejora del abombamiento hepático, los marcadores proteicos son dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, o los siete marcadores proteicos seleccionados de entre fibronectina (P02751), globulina de unión a la tiroxina (P05543), FGF23 (Q9GZV9), LG3BP (Q08380), cofactor de heparina II (P05546), proteína C (P04070) y STAT3 (P40763).

Kits y paneles

[0039] La presente divulgación también proporciona kits, paquetes y paneles de diagnóstico para su uso en el método de la invención. Por ejemplo, los kits pueden incluir anticuerpos, sondas de nucleótidos o cebadores y otros reactivos para medir la expresión de proteínas o ARNm de varias listas de proteínas (por ejemplo, las Tablas 1A-1F, 2A-2F, 3A-3D, 4A-4D, 11A-11D, 12, A y B), tal y como se desvela en el presente documento. En otra realización, el kit o paquete también incluye una terapia adecuada.

Evaluación de los paneles

[0040] Diversas realizaciones desveladas anteriormente incluyen múltiples marcadores proteicos cuya medición se puede realizar de forma conjunta (simultáneamente o secuencialmente). Estas pruebas proporcionarán información para un diagnóstico, un pronóstico y un seguimiento clínico adecuados, sin limitaciones.

5 **[0041]** Se desvela un método para proporcionar información biológica para diagnosticar una enfermedad o afección hepática en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1A-1F, las Tablas 2A-2F o las Tablas 11A-11D) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas realizaciones, las proteínas se seleccionan de entre el componente del complemento 7 (C7), la colectina renal 1 (CL-K1), la
10 proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), la espondina-1 (RSPO1), la subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL5-Ra), la metalopeptidasa de matriz (MMP-7) y la trombospondina-2 (TSP2). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

15 **[0042]** Se desvela otro método para proporcionar información biológica para determinar el estadio de fibrosis de la CRN (la red de investigación clínica de la esteatohepatitis no alcohólica) en un sujeto humano, que incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1A, 2A u 11A) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

20 **[0043]** Se desvela otro método para proporcionar información biológica para determinar el estadio de fibrosis de Ishak en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1B o 2B) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

25 **[0044]** Se desvela otro método para proporcionar información biológica para determinar la NAS (la puntuación de la actividad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico [EHGNA]) en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1C, 2C u 11B) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En
30 algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0045] Se desvela otro método para proporcionar información biológica para caracterizar la esteatosis en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1D o 2D) presentes en una muestra biológica
35 aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0046] Se desvela otro método para proporcionar información biológica para caracterizar la inflamación lobular en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1E, 2E u 11C) presentes en una
40 muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0047] Se desvela otro método para proporcionar información biológica para caracterizar el abombamiento hepático en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 1F, 2F u 11D) presentes en una
45 muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

50 **[0048]** En algunas divulgaciones, el método también comprende realizar un diagnóstico basándose en la información biológica. En algunas divulgaciones, el método también comprende prescribir o administrar al sujeto humano una terapia de acuerdo con el diagnóstico.

[0049] Una divulgación proporciona un método para proporcionar información biológica para evaluar el efecto de un tratamiento en un paciente que padece una enfermedad o afección hepática y que ha recibido el tratamiento, de manera que el método incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3A-3D y 12) presentes en una muestra biológica aislada del paciente. En algunas divulgaciones, las proteínas se seleccionan de entre la fosfatasa y el
55 homólogo de tensina (PTEN), CD70, caspasa 2, cathepsina H (CTSH), esfingosina N-aciltransferasa (LAG-1), piridoxal quinasa (PDXK) y proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0050] Otra divulgación proporciona un método para proporcionar información biológica para evaluar si un paciente con una enfermedad o afección hepática presenta una mejoría en la esteatosis después de un tratamiento, de
65 manera que el método incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve,

diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3A, 4A o 12) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, las proteínas se seleccionan de entre Integrina $\alpha 1\beta 1$ (P56199, P05556), proteína similar a nectina 2 (Q9BY67), PDGF Rb (P09619), LRP8 (Q14114), Ligando CD30 (P32971), Lumican (P51884), SAP (P02743), YKL-40 (P36222), sTie-2 (Q02763), HSP 90a/b (P07900 P08238), TSP2 (P35442) y YES (P07947). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0051] Otra divulgación proporciona un método para proporcionar información biológica para evaluar si un paciente con una enfermedad o afección hepática presenta una mejoría en la inflamación lobular después de un tratamiento, de manera que el método incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3B, 4B o 12) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, las proteínas se seleccionan de entre HSP 90a/b (P07900 P08238), Aminoacilasa-1 (Q03154), FCG3B (075015), M-CSF R (P07333) y Queratina 18 (P05783). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0052] Otra divulgación proporciona un método para proporcionar información biológica para evaluar si un paciente con una enfermedad o afección hepática presenta una mejoría en el abombamiento hepático después de un tratamiento, de manera que el método incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3C, 4C o 12) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, las proteínas se seleccionan de entre fibronectina (P02751), globulina de unión a tiroxina (P05543), FGF23 (Q9GZV9), LG3BP (Q08380), cofactor de heparina II (P05546), proteína C (P04070) y STAT3 (P40763). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0053] Otra divulgación proporciona un método para proporcionar información biológica para evaluar si un paciente con una enfermedad o afección hepática presenta una mejoría en el estadio de fibrosis de CRN después de un tratamiento, de manera que el método incluye medir los niveles de expresión de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, cincuenta, veinte o más proteínas (seleccionadas de las Tablas 3D o 4D) presentes en una muestra biológica aislada del sujeto humano. En algunas divulgaciones, las proteínas se seleccionan de entre pTEN (P60484), CD70 (P32970), Caspasa-2 (P42575), Cathepsina H (P09668), LAG-1 (Q8NHW4), PDXK (O00764) y GTR (Q9Y5U5). En algunas divulgaciones, la medición se lleva a cabo para no más de 20, 25, 30, 35, 40 o 50 proteínas.

[0054] En algunas divulgaciones, el método también incluye realizar una evaluación del tratamiento basándose en la información biológica. En algunas divulgaciones, el método también incluye prescribir o administrar al sujeto humano una terapia de acuerdo con el diagnóstico.

Usos y métodos de tratamiento

[0055] Tras obtener información relacionada con el diagnóstico de una enfermedad o afección hepática, o la confirmación de la eficacia de un tratamiento, la presente divulgación proporciona además diversos usos o métodos de tratamiento adecuados para el paciente. En algunas divulgaciones, se ha analizado al paciente debidamente (usando cualquier realización de la presente divulgación) con uno o más marcadores proteicos, y opcionalmente con otros marcadores o pruebas clínicas. En algunas divulgaciones, el tratamiento utiliza uno o más de los siguientes agentes terapéuticos.

Agentes terapéuticos

[0056] En algunas divulgaciones, los uno o más agentes terapéuticos incluyen -pero no se limitan a- un compuesto desvelado en el presente documento que se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar o prevenir una enfermedad o afección desvelada en el presente documento. En algunas divulgaciones, los uno o más agentes terapéuticos adicionales son un inhibidor de la ECA, un inhibidor de la acetil CoA carboxilasa, un agonista del receptor A3 de la adenosina, un agonista del receptor de la adiponectina, un inhibidor de la proteína cinasa AKT, proteínas cinasas activadas por AMP (AMPK), un agonista del receptor de la amilina, un antagonista del receptor AT-1 de la angiotensina II, inhibidores de la autotaxina, un Lípido bioactivo, un Agonista de la calcitonina, un Inhibidor de la caspasa, un Estimulador de la caspasa 3, un Inhibidor de la cathepsina, un Inhibidor de la caveolina 1, un Antagonista de la quimiocina CCR2, un Antagonista de la quimiocina CCR3, un Antagonista de la quimiocina CCR5, un Estimulador del canal de cloruro, un Inhibidor de la CNR1, un Inhibidor de la ciclina D1, un Inhibidor del citocromo P450 7A1, un Inhibidor de la DGAT1/2, un Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV, un Modulador de la endosialina, un Inhibidor del ligando de la eotaxina, un Modulador de las proteínas de la matriz extracelular, un Agonista del receptor X farnesoide, Inhibidores de la sintasa de ácidos grasos, un Agonista del receptor del FGF1, Ligandos del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-15, FGF-19, FGF-21), un Inhibidor de la galectina 3, un Agonista del receptor del glucagón, un Agonista del péptido 1 similar al glucagón, un Agonista del receptor 1 de ácidos biliares acoplado a proteína G, un Modulador Hedgehog (Hh), un Inhibidor de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C, un Modulador del factor nuclear 4 alfa de los hepatocitos (HNF4A), un Modulador del factor de crecimiento de los hepatocitos, un Inhibidor de la HMG CoA reductasa, un Agonista de la IL-10, un

Antagonista de la IL-17, un Inhibidor del cotransportador ileal sódico de ácidos biliares, un Sensibilizador a la insulina, un Modulador de la integrina, un inhibidor de la cinasa 4 asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK4), un inhibidor de la tirosina cinasa Jak2, un estimulador de Klotho beta, inhibidores de la cetohexocinasa como PF-06835919, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, un inhibidor de la lipoproteína lipasa, un receptor del hígado X, un
 5 estimulador del gen LPL, un antagonista del receptor de lisofosfatidato 1, un inhibidor de la lisil oxidasa homóloga 2, un Inhibidor de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), un Inhibidor de la proteína cinasa MEKK-5, un Inhibidor de la amina oxidasa de cobre de membrana (VAP-1), un Inhibidor de la metionina aminopeptidasa-2, un Modulador de la proteína 2 de unión a metil CpG, un Inhibidor del microARN-21 (miR-21), un Desacoplador mitocondrial como la nitazoxanida, un Estimulador de la proteína básica de la mielina, un Inhibidor de la proteína 3 del dominio PYD de
 10 NACHT LRR (NLRP3), un estimulador de la sirtuina deacetilasa dependiente de NAD, un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX), un agonista del receptor 1 del ácido nicotínico, un estimulador del purinoceptor P2Y13, un inhibidor de la PDE 3, un inhibidor de la PDE 4, un inhibidor de la PDE 5, un modulador del receptor beta del PDGF, un inhibidor de la fosfolipasa C, un agonista del PPAR alfa, un agonista del PPAR delta, un agonista del PPAR gamma, un modulador del PPAR gamma, un Antagonista del receptor 2 activado por proteasa, un Modulador de la proteína
 15 cinasa, un Inhibidor de la proteína cinasa asociada a Rho, un Inhibidor del transportador 2 de glucosa sódica, un Inhibidor del factor de transcripción SREBP, un Inhibidor de STAT-1, un Inhibidor de la esteroil CoA desaturasa-1, un estimulador del supresor de la señalización de citoquinas-1, un estimulador del supresor de la señalización de citoquinas-3, un factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1), un agonista beta del receptor de la hormona tiroidea, un antagonista de TLR-4, un inhibidor
 20 de la transglutaminasa, un modulador del receptor tirosina quinasa, un modulador de GPCR, un modulador del receptor de la hormona nuclear, moduladores de WNT o un modulador de YAP/TAZ.

[0057] Los ejemplos no limitativos de los uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen los siguientes:

25 Inhibidores de la ECA, como el enalapril;
 Inhibidores de la acetil CoA carboxilasa (ACC), como DRM-01, gemcabene, PF-05175157 y QLT-091382;
 Agonistas del receptor de adenosina, como CF-102, CF-101, CF-502 y CGS21680;
 Agonistas del receptor de adiponectina, como ADP-355;
 Agonistas del receptor de amilina/calcitonina, como KBP-042;
 30 Estimuladores de la proteína quinasa activada por AMP, como O-304;
 Antagonistas del receptor AT-1 de la angiotensina II, como el irbesartán;
 Inhibidores de la autotaxina, como PAT-505, PAT-048, GLPG-1690, X-165, PF-8380 y AM-063;
 Lípidos bioactivos, como DS-102;
 Inhibidores del receptor cannabinoide tipo 1 (CNR1), como nacamizumab y GWP-42004;
 35 Inhibidores de la caspasa, como emricasan;
 Inhibidores de la pan-catepsina B, como VBY-376;
 Inhibidores de la pan-catepsina, como VBY-825;
 Antagonistas de la quimiocina CCR2/CCR5, como el cenicriviroc;
 Antagonistas de la quimiocina CCR2, como el propagermanio;
 40 Antagonistas de la quimiocina CCR3, como el bertilimumab;
 Estimuladores de los canales de cloruro, como la cobiprostona;
 Inhibidores de la diglicérido aciltransferasa 2 (DGAT2), como IONIS-DGAT2Rx;
 Inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, como la linagliptina;
 Inhibidores del ligando de la eotaxina, como el bertilimumab;
 45 Moduladores de proteínas de la matriz extracelular, como CNX-024;
 Inhibidores de la sintasa de ácidos grasos, como TVB-2640;
 Inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos 19 (rhFGF19)/citocromo P450 (CYP)7A1, como NGM-282;
 Ligando del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), como BMS-986171, BMS-986036;
 Agonistas del factor de crecimiento de fibroblastos 21(FGF-21)/péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), como YH-
 50 25723;
 Inhibidores de la galectina 3, como GR-MD-02;
 Agonistas del péptido 1 similar al glucagón (GLP1R), como AC-3174, liraglutida, semaglutida;
 Agonistas del receptor de ácidos biliares 1 acoplado a proteína G (TGR5), como RDX-009, INT-777;
 Inhibidores de la proteína de choque térmico 47 (HSP47), como ND-L02-s0201;
 55 Inhibidores de la HMG CoA reductasa, como atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina;
 Agonistas de la IL-10, como la peg-ilodecakin;
 Inhibidores del cotransportador ileal de sodio y ácido biliar, como A-4250, etanolato potásico hidratado de volixibat (SHP-262) y GSK2330672;
 60 Sensibilizadores a la insulina, como KBP-042, MSDC-0602K, Px-102, RG-125 (AZD4076) y VVP-100X;
 Agonistas de beta Klotho (KLB)-FGF1c, como NGM-313;
 Inhibidores de la cetohexocinasa, como PF-06835919;
 Inhibidores de la 5-lipoxigenasa, como tipelukast (MN-001);
 Inhibidores de la lipoproteína lipasa, como CAT-2003;
 65 Estimuladores del gen LPL, como alipogene tiparvovec;

Moduladores del receptor X hepático (LXR), como PX-L603, PX-L493, BMS-852927, T-0901317, GW-3965 y SR-9238;

Antagonistas del receptor de lisofosfatidato-1, como BMT-053011, UD-009, AR-479, ITMN-10534, BMS-986020 y KI-16198;

Inhibidores del homólogo 2 de la lisil oxidasa, como simtuzumab;

Inhibidores de la amina oxidasa sensible a la semicarbazida/proteína de adhesión vascular-1 (SSAO/VAP-1), como PXS-4728A;

Inhibidores de la metionina aminopeptidasa-2, como ZGN-839;

Moduladores de la proteína 2 de unión a metil CpG, como la mercaptamina;

Desacopladores mitocondriales, como el 2,4-dinitrofenol o la nitazoxanida;

Estimuladores de la proteína básica de la mielina, como la olesoxima;

Inhibidores de la NADPH oxidasa 1/4, como GKT-831;

Agonistas del receptor 1 del ácido nicotínico, como ARI-3037MO;

Inhibidores de la proteína 3 de dominio NACHT LRR PYD (NLRP3), como KDDF-201406-03, y NBC-6;

Moduladores de receptores nucleares, como DUR-928;

Estimuladores de purinoceptores P2Y13, como CER-209;

Inhibidores de la PDE 3/4, como tiplelukast (MN-001);

Inhibidores de la PDE 5, como el sildenafil;

Moduladores del receptor beta de PDGF, como BOT-191, BOT-509;

Agonistas de PPAR, como elafibranor (GFT-505), MBX-8025, enantiómero R de pioglitazona deuterada, pioglitazona, DRX-065, saroglitazar e IVA-337;

Antagonistas del receptor-2 activado por proteasa, como PZ-235;

Moduladores de la proteína cinasa, como CNX-014;

Inhibidores de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK), como KD-025;

Inhibidores del transportador sódico de glucosa-2 (SGLT2), como ipragliflozina, remogliflozina etabonato, ertugliflozina, dapagliflozina y sotagliflozina;

Inhibidores del factor de transcripción SREBP, como CAT-2003 y MDV-4463;

Inhibidores de la esteroil CoA desaturasa-1, como el aramchol;

Agonistas beta del receptor de la hormona tiroidea, como MGL-3196, MGL-3745, VK-2809;

Antagonistas de TLR-4, como JKB-121;

Moduladores del receptor tirosina quinasa, como CNX-025;

Moduladores de GPCR, como CNX-023; y

Moduladores de receptores de hormonas nucleares, como Px-102.

[0058] En algunas divulgaciones específicas, los uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de entre A-4250, AC-3174, ácido acetilsalicílico, AK-20, AKN-083, alipogene tiparvovec, aramchol, ARI-3037MO, ASP-8232, atorvastatina, bertilimumab, betaína anhidra, BAR-704, BI-1467335, BMS-986036, BMS-986171, BMT-053011, BOT-191, BTT-1023, BWD-100, BWL-200, CAT-2003, cenicriviroc, CER-209, CF-102, CGS21680, CNX-014, CNX-023, CNX-024, CNX-025, cobiprostona, colesevelam, dapagliflozina, 16-dehidro-pregnenolona, enantiómero R de pioglitazona deuterada, 2,4-dinitrofenol, DRX-065, DS-102, DUR-928, EDP-305, elafibranor (GFT-505), emricasan, enalapril, EP-024297, ertugliflozina, evogliptina, EYP-001, F-351, fexaramina, GKT-831, GNF-5120, GR-MD-02, hidroclorotiazida, éster etílico de icosapento, IMM-124-E, INT-767, IONIS-DGAT2Rx, INV-33, ipragliflozina, Irbesart, propagermanio, IVA-337, JKB-121, KB-GE-001, KBP-042, KD-025, M790, M780, M450, metformina, sildenafil, LC-280126, linagliptina, liraglutida, LJN-452, LMB-763, MBX-8025, MDV-4463, mercaptamina, MET-409, MGL-3196, MGL-3745, MSDC-0602K, nacamizumab, NC-101, ND-L02-s0201, NFX-21, NGM-282, NGM-313, NGM-386, NGM-395, NTX-023-1, ácido norursodesoxicólico, O-304, ácido obeticólico, 25HC3S, olesoxime, PAT-505, PAT-048, peg-ilodecakin, pioglitazona, pirfenidona, PRI-724, PX20606, Px-102, PX-L603, PX-L493, PXS-4728A, PZ-235, RDX-009, RDX-023, etabonato de remogliflozina, tricaprilina reutilizada, RG-125 (AZD-4076), saroglitazar, semaglutida, simtuzumab, SIPI-7623, solitromicina, sotagliflozina, estatinas (atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina), TCM-606F, TERN-101, TEV-45478, tiplelukast (MN-001), TLY-012, tropifexor, TRX-318, TVB-2640, UD-009, ácido ursodesoxicólico, VBY-376, VBY-825, VK-2809, vismodegib, hidrato de etanolato de potasio de volixibat (SHP-626), VVP-100X, WAV-301, WNT-974 y ZGN-839.

[0059] En algunas divulgaciones, el -uno o más- agente terapéutico es un inhibidor de ACC descrito en el documento WO2013/071169. En algunas divulgaciones, el -uno o más- agente terapéutico es un inhibidor de ASK1 descrito en el documento WO2013/112741. En algunas divulgaciones, el -uno o más- agente terapéutico es un agonista de FXR como el que se describe en el documento WO2013/007387. En algunas divulgaciones particulares, los dos agentes terapéuticos son un inhibidor de ASK1 y un inhibidor de ACC. En algunas divulgaciones particulares, los agentes terapéuticos son un agonista de FXR y un inhibidor de ASK1. En otras divulgaciones, los dos agentes terapéuticos son un agonista de FXR y un inhibidor de ACC. En otra divulgación, se utilizan tres agentes terapéuticos: un inhibidor de ASK1, un inhibidor de ACC y un agonista de FXR.

Composiciones farmacéuticas y modos de administración

[0060] Los compuestos proporcionados en el presente documento suelen administrarse en forma de composiciones farmacéuticas. Así, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los compuestos descritos en el presente documento o una sal, tautómero, estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, profármaco o análogo deuterado farmacéuticamente aceptable de los mismos y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables seleccionados de entre portadores, adyuvantes y excipientes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados pueden incluir, por ejemplo, diluyentes y rellenos sólidos inertes, diluyentes, incluida una solución acuosa estéril y diversos solventes orgánicos, potenciadores de la permeación, solubilizantes y adyuvantes. Dichas composiciones se preparan de un modo bien conocido en la técnica farmacéutica. Ver, por ejemplo, 'Remington's Pharmaceutical Science's, Mace Publishing Co., Philadelphia, Pensilvania, Estados Unidos, 17ª Ed. (1985); y 'Modern Pharmaceutics', Marcel Dekker, Inc., 3ª Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.).

[0061] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en dosis únicas o múltiples. La composición farmacéutica puede administrarse usando diversos métodos, por ejemplo por vía rectal, bucal, intranasal y transdérmica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede administrarse mediante inyección intraarterial, por vía intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral o tópica o como inhalante.

[0062] Uno de los modos de administración es el parenteral, por ejemplo mediante inyección. Las formas en las que las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden incorporarse para su administración mediante inyección incluyen, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleosas, o emulsiones, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón o aceite de cacahuete, así como los elixires, el manitol, la dextrosa o una solución acuosa estéril, y otros vehículos farmacéuticos similares.

[0063] La administración oral puede ser otra vía de administración de los compuestos descritos en el presente documento. La administración puede realizarse, por ejemplo, mediante cápsulas o comprimidos con recubrimiento entérico. En la elaboración de las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un compuesto descrito en el presente documento o una sal, tautómero, estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, profármaco o análogo deuterado farmacéuticamente aceptable del mismo, el principio activo suele diluirse con un excipiente y/o introducirse en un soporte que puede tener forma de cápsula, saquito, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede tener la forma de un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, portador o medio para el principio activo. Así, las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

[0064] Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen los siguientes: lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua esterilizada, jarabe y metilcelulosa. Asimismo, las formulaciones pueden incluir agentes lubricantes como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes.

[0065] Las composiciones que incluyen al menos un compuesto descrito en el presente documento o una sal, tautómero, estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, profármaco o análogo deuterado farmacéuticamente aceptable del mismo pueden prepararse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras su administración al sujeto mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica de este campo. Los sistemas de liberación controlada de fármacos para su administración oral incluyen los sistemas de bomba osmótica y los sistemas de disolución que contienen depósitos recubiertos de polímeros o formulaciones de matriz de fármaco-polímero. Se ofrecen diversos ejemplos de sistemas de liberación controlada en las patentes de EE. UU. nº 3,845,770; 4,326,525; 4,902,514; y 5,616,345. Otra formulación que puede usarse en los métodos aquí desvelados emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Estos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua de los compuestos descritos en el presente documento en cantidades controladas. La fabricación y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica de este campo. Ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. nºs 5,023,252, 4,992,445 y 5,001,139. Estos parches pueden fabricarse para una administración continua, pulsátil o según sea necesario de los agentes farmacéuticos.

[0066] Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el principio activo principal puede mezclarse con un excipiente farmacéutico para formar una composición sólida de preformulación que contenga una mezcla homogénea de un compuesto descrito en el presente documento o una sal, tautómero, estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, profármaco o análogo deuterado farmacéuticamente aceptable del mismo. Cuando nos referimos a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo puede estar disperso uniformemente por toda la composición, de modo que esta puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, como comprimidos, píldoras o cápsulas.

[0067] Los comprimidos o píldoras de los compuestos aquí descritos pueden estar recubiertos o mezclados de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada, o para protegerlos de las condiciones ácidas del estómago. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede incluir un componente de dosificación interno y otro externo, este último en forma de envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir a la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Pueden usarse diversos materiales para estas capas o recubrimientos entéricos, entre los que se incluyen diversos ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como la goma laca, el alcohol cetílico y el acetato de celulosa.

[0068] Las composiciones para inhalación o insuflación pueden incluir soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados, tal y como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para obtener un efecto local o sistémico. En otras realizaciones, las composiciones en solventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse usando gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o bien el dispositivo de nebulización puede conectarse a una tienda de campaña con mascarilla(s) o a una máquina de respiración con presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, en suspensión o en polvo pueden administrarse -preferiblemente por vía oral o nasal- desde dispositivos que administran la formulación de una manera adecuada.

EJEMPLOS

[0069] Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar realizaciones específicas de la divulgación. Las personas versadas en la técnica de este campo comprenderán que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen a continuación son técnicas que funcionan correctamente en la práctica de la divulgación y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos específicos para su puesta en práctica. No obstante, a la luz de la presente divulgación, los expertos en la materia comprenderán que pueden realizarse numerosos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aun así obtener un resultado similar sin apartarse por ello del espíritu y el alcance de la divulgación.

Ejemplo 1: Evaluación de SOMAscan como plataforma de descubrimiento para identificar biomarcadores proteicos no invasivos en pacientes con EHNA tratados con selonsertib

[0070] En este ejemplo se empleó SOMAscan para identificar biomarcadores proteicos candidatos para el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad en sujetos con EHNA F2-F3. SOMAscan es una plataforma de descubrimiento de biomarcadores proteómicos y se ha utilizado para identificar biomarcadores proteicos asociados a la enfermedad en sangre y otros fluidos biológicos.

Método:

[0071] Setenta y dos sujetos con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) ($NAS \geq 5$) y fibrosis F2-3 fueron tratados con selonsertib (SEL, un inhibidor de la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1)), con 6 mg o 18 mg por vía oral cada día, solo o en combinación con simtuzumab (SIM, 125 mg SQ semanales) o SIM solo durante 24 semanas. Se analizaron con SOMAscan (SOMALogic, Inc., Boulder, Colorado, Estados Unidos) muestras de suero de referencia y de la semana 24 de estos sujetos de estudio, junto con las muestras de referencia adicionales F0, F1 y F4. Se examinaron las asociaciones de 1300 proteínas con los estadios de fibrosis y los componentes del NAS al inicio y después de 24 semanas.

Resultados:

[0072] El análisis univariante identificó 28 proteínas que están asociadas significativamente ($p < 0,001$ tanto para la prueba de Kruskal-Wallis como para la prueba de Jonckheere-Terpstra; en las tablas siguientes sólo se muestran los valores p de la prueba de Kruskal-Wallis; los marcadores proteicos representativos para los estadios de fibrosis de CRN se muestran en la Figura 1) con el estadio de fibrosis de CRN, 18 proteínas que están asociadas significativamente con el estadio de fibrosis Ishak, 34 proteínas que están asociadas significativamente con la puntuación NAS, 7 proteínas que están asociadas significativamente con la esteatosis, 39 proteínas que están asociadas significativamente con la inflamación lobular y 53 proteínas que están asociadas significativamente con el abombamiento hepático al inicio del estudio. Entre estas proteínas, varios marcadores (ACY1, HSP90a/b e Integrina $\alpha 1b1$) están asociados con el estadio de fibrosis, la esteatosis, la inflamación lobular y el abombamiento hepático. Los resultados univariantes se presentan a continuación en la Tabla 1A-F (los niveles de expresión proteica se muestran en unidades de fluorescencia relativa [RFU], que es lo que lee el instrumento).

Tablas 1A-F: Marcadores proteicos para el diagnóstico

[0073]

Tabla 1A. Marcadores proteicos para estadios de fibrosis de la CRN (CRN)

Nombre del marcador	UniProt	Valor p	Estadio de Fibrosis de CRN 0	Estadio de Fibrosis de CRN 1	Estadio de Fibrosis de CRN 2	Estadio de Fibrosis de CRN 3	Estadio de Fibrosis de CRN 4
Colectina renal 1	Q9BWP8	2.21E-09	5987.2	4903.3	8174.95	11267.55	15604.5

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Valor p	Estadio de Fibrosis de CRN 0	Estadio de Fibrosis de CRN 1	Estadio de Fibrosis de CRN 2	Estadio de Fibrosis de CRN 3	Estadio de Fibrosis de CRN 4
C7	P10643	4.14E-09	2173.6	1930.4	2330.55	2590.2	3379.95
IGFBP-7	O16270	1.09E-07	5898.4	6361.5	7167.65	8593.2	9992.25
MMP-7	P09237	2.21E-07	1220.8	1321.9	1577.3	2013.65	2684.1
Espondina-1	Q9HCB6	1.53E-06	1600.8	1760.5	1825.3	2131.55	3023.9
TSP2	P35442	2.29E-06	575.9	879.3	1396.65	1761.05	1791.45
sE-Selectina	P16581	3.18E-05	23557.3	25301.3	29424.7	36202.85	49398.9
IL-1 sRI	P14778	4.52E-05	3858.3	3942.3	4198.55	5472.45	7327.05
6Ckina	O00585	4.25E-05	5152.7	4733.2	5371.65	6293.8	7693.5
LTBP4	Q8N2S1	5.35E-05	935.5	1033.7	1098.4	1210.85	1467
MIC-1	Q99988	3.48E-05	569.4	657	917	1046.05	1246.8
XPNPEP1	Q9NQW7	8.45E-05	2285.1	2688.5	3077.95	3519.55	4201.25
IL-18 BPa	O95998	1.14E-05	6253.3	7763.5	8939.8	8942.1	12208.5
SHP-2	Q06124	0.00014999	2444.7	2746.1	3160.2	3676.75	4811.5
IL-19	Q9UHD0	0.00054898	6650.8	6412	7286.7	8225.55	9611.05
ERAB	Q99714	0.00024364	915.8	1030.6	1101	1340.2	1274.2
BSSP4	Q9GZN4	0.00019407	816.3	900.9	974.95	1073.35	1316.85
HSP 70	P0DMV8	0.00084118	5665	6574.1	7380.75	8344.75	10561.55
SEM6B	Q9H3T3	0.00013854	3329.4	4060.3	4452.6	4726.25	6304.8
SLAF7	Q9NQ25	0.00052829	46254.9	45233.4	48063.25	56140.5	74638.2
CD48	P09326	0.00075613	623.6	660	672.5	747.35	758.55
FSTL3	O95633	0.00088627	3254.9	3410	3497.55	3948.25	4403.1
sCD163	Q86VB7	0.00058386	2026.6	2190.2	2614.75	2745.6	3265.25

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Valor p	Estadio de Fibrosis de CRN 0	Estadio de Fibrosis de CRN 1	Estadio de Fibrosis de CRN 2	Estadio de Fibrosis de CRN 3	Estadio de Fibrosis de CRN 4
NADPH-P450 Oxidorreductasa	P16435	0.00043972	5941	6559.3	9070.3	10918.25	11295.15
LIF sR	P42702	0.00084016	3449.2	3827	3873.75	4142.7	5350.85
IL-8	P10145	0.00084147	1456.2	1572.7	1836.55	1895.75	2405.2
Ligando de CD30	P32971	0.0002216	2017.3	2341.4	2410.75	2459.35	2877.35
SAP	P02743	0.00035833	34662	31095.8	29256.95	28337.7	23256.35

Tabla 1B. Marcadores proteicos para estadios de fibrosis de Ishak (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	Uni. Prot.	Valor p	Estadio de fibrosis de Ishak 0	Estadio de fibrosis de Ishak 1	Estadio de fibrosis de Ishak 2	Estadio de fibrosis de Ishak 3	Estadio de fibrosis de Ishak 4	Estadio de fibrosis de Ishak 5	Estadio de fibrosis de Ishak 6
Colectina renal ₁	Q9BWP8	5.05E-09	4963.25	5586.5	8304.6	9376.5	13458.5	11252.75	24984.7
C7	P10843	3.44E-08	2040.3	1972.6	2339.6	2419.1	2837.8	3313.525	3711.1
IGFBP-7	Q16270	3.41E-07	5739.9	6361.5	7210.5	7783.2	8979	8668.9	10130.15
MMP-7	P09237	1.14E-06	1271.35	1304	1590.9	1904.2	2313.6	2836.075	2784.5
TSP2	P35442	1.53E-06	738.85	859.4	1375.9	1476.8	2288.8	2220.55	1791.45
sE-Selectina	P16581	4.76E-05	22373.85	25498	29931	34267.9	41464.2	40645.18	50563
LTBP4	Q6N2S1	6.18E-05	930.3	1059.7	1102.7	1113.8	1247.7	1466.4	1501
MIC-1	Q99998	4.79E-05	561.3	657	917.9	936.9	1144.1	1334.4	1236.3
IL-1 sRI	P14778	0.000214	3701.65	3942.3	4265.2	5393.4	5330.4	7033.1	6845.45
6Ckina	O00585	0.000257	4942.95	4852	5341.4	6155.1	6818.5	7692.525	7354.8
Espondina-1	Q9HCB6	3.82E-05	1595.9	1871.4	1842.2	2112.1	2123.4	2916.7	3102.6
XPNPEP1	Q9NCW7	0.000539	2282.3	2753.5	3094.8	3447.2	3868	4279.625	4090.7
ERAB	Q99714	0.000995	989.1	1030.6	1105.1	1258.2	1500.6	1498.35	1345.45

(continuación)

Nombre del marcador	Uni. Prot.	Valor p	Estadio de fibrosis de Ishak 0	Estadio de fibrosis de Ishak 1	Estadio de fibrosis de Ishak 2	Estadio de fibrosis de Ishak 3	Estadio de fibrosis de Ishak 4	Estadio de fibrosis de Ishak 5	Estadio de fibrosis de Ishak 6
BSP4	Q9GZN4	0.000525	858.6	896.9	981.2	1023.6	1187.2	1443.1	1316.85
SAP	P02743	0.000271	31665.7	31374.3	29587.8	30274.7	27366.6	26341.85	20586.05
IL-19	Q9UHD0	0.001486	6639.5	6646.5	7290.4	7639.5	8622.7	8096	10594.2
IL-8	P10145	0.000723	1456	1584.9	1742.2	1857	1982.8	2554.575	2611.3
SEM6B	Q9H3T3	0.000799	3305.25	4083	4488.2	4487.5	4742.2	6840.3	6304.8

Tabla 1C. Marcadores proteicos para puntuaciones NAS (NAS) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	Uni. Prot.	Valor de p	Estadios de NAS											
			4003.1	5770.9	9341.9	10238.4	14257.5	17923.1	23098.7	19241.9				
Aminoacilasa-1	Q03154	5.29E-10												
Integrina $\alpha 1 \beta 1$	P56199, P05556	3.17E-09	781	926.8	956.1	1269.5	1309.1	2086.25	2542.2	1635				
TSP2	P35442	5.02E-09	603.9	652.1	901.8	975.3	1458.6	1773.25	2363.5	2284.4				
HSP 90a/b	P07900, P08238	5.26E-09	2710.5	3648.6	3606.3	4344.65	4465.1	5661.85	7165.9	7471.5				
HSP 90b	P08238	7.07E-09	11239.4	14527.4	16297.7	18441.65	18554	24236.45	27701.9	29499.4				
NADPH-P450 Oxidoreductasa	P16435	8.42E-09	4256.6	5687.5	6126.2	7149.85	8088	11520.7	12706.2	16688.9				
KYNU	Q16719	9.53E-09	1596.4	1306.5	1749.9	1755.4	2097.9	2830.7	3690.6	3831.1				
ERAB	Q99714	2.59E-07	985.9	901.3	937.4	1032.15	1135.2	1434.65	1396.2	1497.4				
PHI	P06744	3.24E-07	338.2	503.6	472.7	575.3	724.1	789.65	755.2	1174.4				
FTCD	Q95954	3.24E-07	2750.3	8373.4	8231.4	18059.9	21526.2	31366.9	34054.8	46087.7				
HSP 70	P0DMV8	6.89E-07	4723.9	5461.8	6315	7491.25	7694.2	8903.45	10700.5	10243.7				
sE-Seleccina	P16581	1.74E-06	16016.8	20281.3	29931	28256.45	30675.2	36832.25	41029	45677.7				
Testican-1	Q08629	2.15E-06	11858.9	9319.1	9409.3	9169.7	7865.6	7660.65	7354.7	8924.2				

(continuación)

Nombre del marcador	Uni. Prot.	Valor de p	Estadios de NAs									
			35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
Apom	Q95445	2.99E-06	5405.9	3828.2	4477.2	3809.6	3240.1	3155.35	3195.5	3026.8		
XPNEP1	Q9NQW7	6.28E-06	1941.6	2384.2	2429.7	2932.9	3328.7	3635.1	4251.6	4766.6		
HEMK2	Q9Y5N5	6.63E-06	11355.9	9257	9987.2	8659.15	7762	7573.85	7178	8489.3		
Colectina renal 1	Q9BWP8	1.92E-05	4522.9	4689.7	7122.6	8226.4	8045.3	12168	16342.4	10018.1		
ENH1	Q6LWV6	2.20E-05	6355.4	2192	4459.6	6498.85	7703.1	6493.85	10944.8	12407.3		
AK1A1	P14550	2.51E-05	1170	1582.5	1771.3	1691.95	1915.8	2408.75	3121.6	2642.9		
Inhibidor de la C1- esterasa	P05155	2.74E-05	6066.3	7494.9	8541.6	6895.8	6346.3	5897.9	6176.7	5234.7		
HSP70 proteína 8	P11142	3.25E-05	2452.1	2911.8	2861.3	2979.2	3134.4	3255.35	3466.1	4060.1		
Citocromo c	P99999	9.34E-05	1771.5	1339.2	1412.4	1316.25	1244.5	1194	1205.1	1314.5		
C7	P10643	0.000107	1939.4	2111.3	2267.9	2153.35	2368.8	2643.25	3093.5	2804.6		
Catepsina D	P07339	0.00025	867.8	731	955.1	893.8	1054.5	1200.2	1402.9	1037.7		
Ligando CD30	P32971	0.000279	2209.5	2067.4	2239	2420.4	2458	2524.5	2689.7	2568.3		

(continuación)

		Estadíos de NAS									
Nombre del marcador	Uni. Prot.	Valor de p									
YES	P07947	0.000323	1122.1	1187	1331.5	1359.2	1426.9	1522.05	1684.5	1692.5	
PiGR	P01833	0.000487	3151.5	2740.5	4116.2	3579.5	4070.7	4843.85	4827.2	6861.9	
QORL1	Q95825	0.000554	2484.4	2828.5	3099.3	3354.25	3708.7	3837.05	2982.6	3195.1	
AMPM2	P50579	0.000585	9067.1	10689.6	14417.8	13313.45	13071.7	16369.35	16596.3	20628.8	
IL-19	Q9UHD0	0.000619	5871.2	5731.1	7359.9	6945.55	7826.4	7867.15	10139.2	7308	
BMP-1	P13497	0.000632	843.3	886.9	1257.2	1245.3	1141.3	1153.3	1272.7	1329.6	
CAMK2D	Q13557	0.000684	2680.4	2866.5	2892.3	3264.25	3420.5	3633.15	3776.1	4058.2	
sCD163	Q86VB7	0.000766	2429.2	1943.2	2362.6	2258.15	2717.5	2782.95	2917.8	3033	
M-CSF R	P07333	0.000838	321.9	246.8	294.6	320.35	361.3	356.35	486.9	367	

Tabla 1D. Marcadores proteicos de esteatosis (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de esteatosis 0	Estadio de esteatosis 1	Estadio de esteatosis 2	Estadio de esteatosis 3
HSP 90b	P08238	0.000218	14145.9	19107.9	22238.45	26074
HSP 90a/b	P07900 P08238	0.000221	3373.4	4670.85	5334.6	6426.6
HSP 70	P0DMV8	0.000354	5647.5	8043.75	8569.6	7897.6
CAMK2D	Q13557	0.000453	2680.4	3298.3	3753.95	3728.9
Integrina α 1b1	P56199, P05556	0.000688	866.5	1478.55	1602.65	1464.8
Aminoacilasa-1	Q03154	0.000779	6993	13331	15128.35	18432.1

Tabla 1E. Marcadores proteicos de inflamación lobular (LI) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de inflamación lobular 0	Estadio de inflamación lobular 1	Estadio de inflamación lobular 2
NADPH-P450 Oxidorreductasa	P16435	3.03E-11	5303.25	7040	12303.55
Aminoacilasa-1	Q03154	2.63E-11	6042.6	11085.1	19724.4
Integrina α 1b1	P56199, P05556	2.75E-11	869.1	1233.25	2041.7
KYNU	Q16719	2.69E-10	1400.15	1837.35	3042.45
HSP 90b	P08238	3.87E-10	14336.65	17853.9	25489.65
HSP 90a/b	P07900, P08238	2.36E-09	3646.55	4192.55	6228.25
FTCD	O95954	1.62E-08	5909.3	14891.15	32845.3
ERAB	Q99714	2.01E-08	911.15	1083	1386.65
HSP 70	P0DMV8	4.56E-08	5751.85	7117.95	9299.45
XPNPEP1	Q9NQW7	2.09E-07	2446.55	2814.9	3918.35
PHI	P06744	1.73E-07	472.1	592.95	861.4
Colectina renal 1	Q9BWP8	3.68E-07	4675.05	7928.35	12412.75
sE-Selectina	P16581	5.63E-07	18974.2	29030.55	38522.55

(continuación)

5	Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de inflamación lobular 0	Estadio de inflamación lobular 1	Estadio de inflamación lobular 2
	TSP2	P35442	7.19E-07	647.3	1112.8	1953.2
10	AK1A1	P14550	1.95E-06	1572.15	1784.1	2571.85
	Dopa descarboxilasa	P20711	5.65E-06	335.95	341.85	415.3
15	HTRA2	O43464	1.73E-05	4398.7	4940.3	5524.3
	YES	P07947	2.33E-05	1178.4	1335.15	1612.3
20	ApoM	O95445	2.90E-05	4449.85	3773.2	3155.35
	AMPM2	P50579	3.23E-05	11354.55	13312.3	16787.55
25	IGFBP-7	Q16270	3.56E-05	6824.55	7146.1	8682.05
	Inhibidor de C1- Esterasa	P05155	7.05E-05	7848.45	6795.4	5911.95
30	C7	P10643	0.000127	2111.25	2284.6	2665.55
	PIK3CA/PIK3R1	P42336 P27986	0.000174	777.1	826.75	922
35	HSP70 proteína 8	P11142	0.000131	2903.05	2959.65	3370.4
	PIGR	P01833	7.61E-05	2946	3806.8	4801.1
40	Ligando de CD30	P32971	5.74E-05	2126.05	2395.3	2611.6
	IGFBP-5	P24593	0.000147	1792.4	1881.85	1671.25
45	NAGK	Q9UJ70	0.000234	816.05	931.05	1051.2
	PLXB2	O15031	0.000303	2789.9	3417.55	3817.1
50	IL-19	Q9UHD0	0.000307	5868.8	7329.4	8338.8
	sCD163	Q86VB7	0.000396	2001.7	2413.4	2846.25
55	MDHC	P40925	0.0006	10621.8	12866.5	15239.55
	PLXC1	O60486	0.000462	801.4	863.9	973.3
60	IL-1 sRII	P27930	0.000441	7385.85	8902.45	10079.9

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de inflamación lobular 0	Estadio de inflamación lobular 1	Estadio de inflamación lobular 2
HEMK2	Q9Y5N5	0.000244	9389.7	8514.75	7863.05
Testican-1	Q08629	0.000375	9543.6	8546.45	7860.5
NSE	P09104	0.000543	1103.55	1001.9	929
Catepsina D	P07339	0.00084	806.9	959.85	1153.2

Tabla 1F. Marcadores proteicos para el abombamiento hepático (HB) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de abombamiento hepático 0	Estadio de abombamiento hepático 1	Estadio de abombamiento hepático 2
TSP2	P35442	3.86E-12	767.6	1105.2	1973.2
Aminoacilasa-1	Q03154	5.85E-10	9112.9	11498.3	17923.1
ERAB	Q99714	1.85E-09	985.9	1062.8	1364.45
Integrina $\alpha 1b1$	P56199, P05556	4.79E-09	949.1	1291.2	2006.25
HSP 90a/b	P07900 P08238	7.19E-09	3648.6	4465.1	5581.3
NADPH-P450 Oxidorreductasa	P16435	7.22E-09	5941	8104.5	11520.7
HSP 90b	P08238	1.28E-08	15659.5	18730.6	23601.1
C7	P10643	1.07E-08	2100.3	2173.8	2706.1
Colectina renal 1	Q9BWP8	3.82E-09	5987.2	8714.3	11197.75
KYNU	Q16719	2.94E-08	1596.4	1796.6	2883.4
PHI	P06744	3.31E-08	472.7	577.1	789.65
XPNPEP1	Q9NQW7	1.26E-07	2404.7	3127.6	3706.4
Catepsina D	P07339	5.34E-07	778.3	924.5	1214.15
FTCD	O95954	3.47E-07	8873.4	16470.2	30715.2
HSP 70	P0DMV8	6.08E-07	6129.5	7057.1	9118.35

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de abombamiento hepático 0	Estadio de abombamiento hepático 1	Estadio de abombamiento hepático 2
AK1A1	P14550	2.99E-07	1582.5	1757.3	2286.8
sCD163	Q86VB7	1.68E-07	1966.1	2472.6	2863.15
HEMK2	Q9Y5N5	8.82E-07	9257	8618.6	7700.3
ApoM	O95445	2.58E-07	4477.2	3640	3174.15
sE-Selectina	P16581	1.23E-06	25015.8	29949.5	36832.25
Testican-1	Q08629	2.69E-06	9409.3	8911.2	7820.55
HSP70 proteína 8	P11142	9.96E-06	2844.1	2991.3	3343
Citocromo c	P99999	9.56E-06	1369.4	1317.6	1205.7
SHP-2	Q06124	8.69E-06	2489.8	2969.1	3735.45
Ligando de CD30	P32971	3.86E-06	2123.2	2429.3	2611.6
Inhibidor de C1-Esterasa	P05155	2.92E-05	7494.9	6866.2	6074.35
YES	P07947	3.45E-05	1219.3	1348.4	1569
PIGR	P01833	3.58E-05	3612.4	3694.2	4973.5
PLXC1	O60486	3.54E-05	801.1	898.8	964.3
IL-1 sRI	P14778	6.90E-05	3581.3	4558.4	5651.75
M-CSF R	P07333	7.07E-05	283.4	324.8	371.55
CAMK2D	Q13557	5.51E-05	2931.9	3127.5	3711.65
FABPL	P07148	9.97E-05	4770.5	5401.5	6909.6
HSP 60	P10809	0.000107	1757	1693.8	1972.3
IGFBP-7	Q16270	0.000172	6612.2	7445	8525.65
Gelsolina	P06396	0.000172	553.7	520.1	464.05
CD48	P09326	0.000204	657.9	688.7	753.05

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de abombamiento hepático 0	Estadio de abombamiento hepático 1	Estadio de abombamiento hepático 2
PSA	P07288	0.000237	1664.7	1435.4	1245
IGFBP-5	P24593	0.000229	1999.2	1787	1700.5
MMP-7	P09237	0.00022	1365.3	1604.2	2048.9
IL-19	Q9UHD0	0.000303	6650.8	7034.5	8107.95
AMPM2	P50579	0.000336	12818.4	13425.9	16362.15
Proteína tipo nectina 2	Q9BY67	0.000463	1700.5	1818.9	1997.55
Glutamato carboxipeptidasa	Q96KP4	0.000262	4745.6	4343	4036.1
CATZ	Q9UBR2	0.000709	4278.7	4655.3	5183.05
ENPP7	Q6UWV6	0.000121	3489.3	6355.8	7882.05
PLXB2	O15031	0.000752	3023.5	3310.8	3786
IL-18 BPα	O95998	0.000771	7737.2	8266.1	9431.35
Dopa descarboxilasa	P20711	0.000963	337.7	366.2	404.55
STAT1	P42224	0.000756	713.3	800.6	918.45
FSTL3	O95633	0.000891	3377.9	3393.1	4021.05
IL-18 Ra	Q13478	0.00034	1010.8	965.4	1109.1
IL-1 R AcP	Q9NPH3	0.00022	16533.8	13461.7	12779.85

[0074] Los marcadores de las Tablas 1A-F se filtraron manualmente con sus actividades y otra información, de manera que las listas filtradas se presentan en las Tablas 2A-F de más abajo.

Tablas 2A-F: Marcadores proteicos para diagnóstico, filtrados**[0075]**

5 Tabla 2A. Marcadores proteicos para estadios de fibrosis de CRN; filtrados

	Nombre del marcador	UniProt
10	MMP-7	P09237
	Espondina-1	Q9HCB6
15	sE-Selectina	P16581
	IL-1 sRI	P14778
20	6Ckina	O00585
	LTBP4	Q8N2S1
25	MIC-1	Q99988
	XPNPEP1	Q9NQW7
30	IL-18 BP _a	O95998
	SHP-2	Q06124
35	IL-19	Q9UHD0
	ERAB	Q99714
	BSSP4	Q9GZN4
40	HSP 70	P0DMV8
	SEM6B	Q9H3T3
45	SLAF7	Q9NQ25
	CD48	P09326
50	FSTL3	O95633
	sCD163	Q86VB7
55	LIF sR	P42702
	IL-8	P10145
60	Ligando de CD30	P32971
	SAP	P02743

65

Tabla 2B. Marcadores proteicos para estadios de fibrosis de Ishak; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
MMP-7	P09237
sE-Selectin a	P16581
LTBP4	Q8N2S1
MIC-1	Q99988
IL-1 sRI	P14778
6Ckina	O00585
Espondina-1	Q9HCB6
XPNPEP1	Q9NQW7
ERAB	Q99714
BSSP4	Q9GZN4
SAP	P02743
IL-19	Q9UHD0
IL-8	P10145
SEM6B	Q9H3T3

Tabla 2C. Marcadores proteicos para puntuaciones NAS; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
HSP 90b	P08238
ERAB	Q99714
PHI	P06744
FTCD	O95954
HSP 70	P0DMV8
sE-Selectina	P16581
Testican-1	Q08629
ApoM	O95445

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
XPNPEP1	Q9NQW7
HEMK2	Q9Y5N5
ENPP7	Q6UWW6
AK1A1	P14550
Inhibidor de C1-Esterasa	P05155
HSP70 proteína 8	P11142
Citocromo c	P99999
Catapsina D	P07339
Ligando de CD30	P32971
YES	P07947
PIGR	P01833
QORL1	O95825
AMPM2	P50579
IL-19	Q9UHD0
BMP-1	P13497
CAMK2D	Q13557
sCD163	Q86VB7

Tabla 2D. Marcadores proteicos de esteatosis; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
HSP 70	P0DMV8
CAMK2D	Q13557

Tabla 2E. Marcadores proteicos de inflamación lobular; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
HSP 90b	P08238
FTCD	O95954
ERAB	Q99714
HSP 70	P0DMV8
XPNPEP1	Q9NQW7
PHI	P06744
sE-Selectina	P16581
AK1A1	P14550
HTRA2	O43464
YES	P07947
ApoM	O95445
AMPM2	P50579
Inhibidor de C1-Esterasa	P05155
HSP70 proteína 8	P11142
PIGR	P01833
Ligando de CD30	P32971
IGFBP-5	P24593
PLXB2	O15031
IL-19	Q9UHD0
sCD163	Q86VB7
MDHC	P40925
PLXC1	O60486
IL-1 sRII	P27930
HEMK2	Q9Y5N5

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
Testican-1	Q08629
NSE	P09104
Catepsina D	P07339

Tabla 2F. Marcadores proteicos de abombamiento hepático; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
ERAB	Q99714
PHI	P06744
XPNPEP1	Q9NQW7
Catepsina D	P07339
FTCD	O95954
HSP 70	P0DMV8
AK1A1	P14550
sCD163	Q86VB7
HEMK2	Q9Y5N5
ApoM	O95445
sE-Selectina	P16581
Testican-1	Q08629
HSP70 proteína 8	P11142
Citocromo c	P99999
SHP-2	Q06124
Ligando de CD30	P32971
Inhibidor de C1-Esterasa	P05155
YES	P07947
PIGR	P01833

(continuación)

5	Nombre del marcador	UniProt
	PLXC1	O60486
	IL-1 sRI	P14778
10	CAMK2D	Q13557
	FABPL	P07148
15	HSP 60	P10809
	Gelsolina	P06396
20	CD48	P09326
	PSA	P07288
25	IGFBP-5	P24593
	MMP-7	P09237
30	IL-19	Q9UHD0
	AMPM2	P50579
35	Proteína similar a la nectina 2	Q9BY67
	Glutamato carboxipeptidasa	Q96KP4
	CATZ	Q9UBR2
40	ENPP7	Q6UWV6
	PLXB2	015031
45	IL-18 BPa	O95998
	STAT1	P42224
50	FSTL3	O95633
	IL-18 Ra	Q13478
55	IL-1 R AcP	Q9NPH3

60 **[0076]** La Figura 2 muestra que los marcadores proteicos comunes están presentes entre diferentes variables de diagnóstico (FIBSG: estadios de fibrosis de CRN; STEATOSI: esteatosis; NASLI: inflamación lobular de NAS; NASHB: abombamiento hepático de NAS; NASGRP: puntuación de NAS). En la Tabla A de más abajo se resumen algunos solapamientos:

65

Tabla A. Marcadores proteicos comunes entre grupos

Grupo	Marcadores
Único para la fibrosis de CRN (10)	6Ckina, BSSP4, IL-8, LIF sR, LTBP4, MIC-1, SAP, SEM6B, SLAF7, Espondina-1
Único para HB (10)	CATZ, FABPL, gelsolina, glutamato carboxipeptidasa, HSP 60, IL-1 R AcP, IL-18 Ra, proteína similar a la nectina 2, PSA, STAT1
Único para L (6)	HTRA2, IL-1 sRII, MDHC, NAGK, NSE, PIK3CA / PIK3R1
Común a las 5 variables de respuesta (1)	HSP 70
Común a la fibrosis de CRN/HB (6)	CD48, FSTL3, IL-1 sRI, IL-18 BPa, MMP-7, SHP-2
Común a la fibrosis de CRN/HS/LI (1)	IGFBP-7
Común a la fibrosis de CRN/NAS/HB/LI (10)	C7, ligando CD30, colectina renal 1, ERAB, IL-19, oxidorreductasa NADPH-P450, sCD163, sE-Selectina TSP2, XPNPEP1
Común a NAS/HB/LI/esteatosis (4)	Aminoacilasa-1, HSP 90a/b, HSP 90b, Integrina a1b
Común a NAS/HB (3)	Citocromo c, ENPP7, M-CSF R
Común a HB/LI(4)	Dopa descarboxilasa, IGFBP-5, PLXB2, PLXC
Común a NAS/HB/esteatosis (1)	CAMK2D
Común a NAS/HB/LI (13)	AK1A1, AMPM2, ApoM, inhibidor de la esterasa C1, catepsina D, FTCD, HEMK2, proteína 8 de HSP70, KYNU, PHI, PmGR, Testican-1, YES

[0077] El análisis multivariante también identificó un panel de 7 marcadores proteicos (C7, CL-K1, IGFBP7, Espondina 1, IL-5Ra [UniProt: Q01344], MMP-7 y TSP2) que poseen un buen valor diagnóstico para clasificar a los sujetos con EHNA con fibrosis grave (F0-1 frente a F3-4; AUROC: 0,83; Figura 3). Los cambios en los niveles circulantes de los biomarcadores se reflejaron generalmente en la expresión de sus ARN correspondientes mediante RNaseq de secciones de hígado fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE).

[0078] Los cambios longitudinales de varios marcadores proteicos (KYNU, Integrina a1b1, CL-K1, C7, ACY1 y TSP2) que están asociados con el estadio de fibrosis o la puntuación NAS al inicio del estudio también se correlacionan significativamente con la mejora de una o más características clínicas de la EHNA (fibrosis, esteatosis e inflamación lobular). En las Tablas 3A-D de más abajo se proporciona la lista detallada de marcadores proteicos para monitorizar las características clínicas de mejora.

Tablas 3A-D: Marcadores proteicos para monitorizar las mejoras clínicas

[0079]

Tabla 3A. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría de la esteatosis (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	% medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	% medio de CHG en la sem. 24 en personas que mejoran	Valor p
KYNU	Q16719	-6.785	-30.97	6.57E-05

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
Proteína similar a la nectina 2	Q9BY67	7.925	-7.93	0.000107
Ligando CD30	P32971	0.81	-9.18	0.000215
YKL-40	P36222	13.28	-14.29	0.000368
TSP2	P35442	21.215	-25.59	0.000493
PCSK7	Q16549	7.995	-3.57	0.000522
IR	P06213	0.875	-13.12	0.000576
AK1A1	P14550	-8.95	-28.48	0.000586
FLRT3	Q9NZU0	3.09	-10.72	0.000586
TIMD3	Q8TDQ0	4.615	-8.75	0.00062
SAP	P02743	-1.14	5.44	0.000695
YES	P07947	-0.1	-11.71	0.000706
Integrina α 1b1	P56199, P05556	-5.025	-41.26	0.000724
CNTN2	Q02246	3.91	-6.28	0.000821
sTie-2	Q02763	-0.925	-8.34	0.000821
Lumican	P51884	4.69	-6.81	0.000821
HSP 70	P0DMV8	-0.875	-27.05	0.000868

Tabla 3B. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría de la inflamación lobular (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
M-CSF R	P07333	5.72	-12.625	4.58E-05
ACE2	Q9BYF1	-2.05	2.605	0.000138
FCG3B	075015	-1.44	-14.29	0.000191

(continuación)

	Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
5					
10	IL24	Q13007	2.03	-3.985	0.00038
	ERAB	Q99714	2.01	-26.665	0.000429
15	Queratina 18	P05783	-0.96	4.1	0.000515
	Aminoacilasa-1	Q03154	-11.97	-37.08	0.000727
20	PHI	P06744	-5.37	-30.06	0.000862
	C4	P0C0L4, P0C0L5	-2.53	7.51	0.001019
25	HSP 90a/b	P07900 P08238	-4.98	-21.04	0.001202
	CHST2	Q9Y4C5	1.67	-5.34	0.001291
30	Integrina α 1b1	P56199, P05556	-5.31	-34.885	0.00195
35	PIK3CA/PIK3R1	P42336 P27986	-2.3	-13.095	0.001996
	Catepsina D	P07339	4.99	-14.74	0.002711
40	NADPH-P450 Oxidoreductasa	P16435	-8.01	-37.395	0.002777
	CBG	P08185	-2.61	1.495	0.003557
45	MDM2	Q00987	1.43	-3.26	0.004668
	C7	P10643	5.79	-7.535	0.004745
50	CD5L	O43866	6.76	-6.625	0.00581
	IL-8	P10145	-4.72	-15.795	0.005992
55	LYVE1	Q9Y5Y7	4.61	-4.21	0.00661
	Eotaxina	P51671	4.34	15.185	0.007197
60	Albúmina	P02768	-0.65	13.88	0.007351
	Histona H2A.z	P0C0S5	10.31	-8.545	0.007519

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
KIF23	Q02241	-2.64	2.93	0.007519
ALT	P24298	-0.07	-9.27	0.008514
EPO-R	P19235	-1.13	2.2	0.008591
STX1a	Q16623	3.03	-2.59	0.00906
MED-1	Q15648	-2.61	11.545	0.009378

Tabla 3C. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría del abombamiento hepático (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
Proteína C	P04070	-0.09	9.69	0.000589
LG3BP	Q08380	7.44	-7.56	0.006607
Catepsina D	P07339	4.95	-15.96	0.01054
Factor de coagulación Xa	P00742	0,825	6,52	0,010541
Globulina fijadora de tiroxina	P05543	-1.5	-7.58	0.014594
XEDAR	Q9HAV5	-0.875	1.66	0.014887
CBG	P08185	-2.655	1.44	0.015188
HGF	P14210	-4.445	-9.9	0.015802
LTBP4	Q8N2S1	2.525	-5.93	0.017776
Eotaxina-2	000175	-0.04	4.07	0.018122
B7-H2	075144	-5.27	-12.52	0.01921
JAG1	P78504	2.6	0.16	0.019963
STAT3	P40763	-4.58	-8.59	0.020743

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
VEGF sR2	P35968	-1.275	4.03	0.020744
Laminina	P25391, P07942, P11047	2.15	-8.68	0.021551
Topoisomerasa I	P11387	6.47	-13.48	0.021551
IGFBP-5	P24593	-0.695	6.44	0.023245
Cofactor II de heparina	P05546	-1,345	3,88	0,024135
Osteopontina	P10451	-1.54	1.79	0.024585
BAFF	Q9Y275	2.16	-7.94	0.026002
IL-13 Ra1	P78552	-0.565	5.91	0.026002
PH	P01298	6.14	-3.88	0.026004
EphA1	P21709	1.83	8.65	0.026984
HINT1	P49773	-10.655	-30.56	0.026984
Calicreína 12	Q9UKR0	-1,51	3,44	0,026984
M2-PK	P14618	-3.615	-22.55	0.026984
Linfotoxina b R	P36941	-0,575	3,35	0,027996
C3	P01024	-3.82	-24.36	0.029041
pTEN	P60484	-0.705	-5.01	0.029041
Fucosiltransferasa 3	P21217	3.205	-1.89	0.031232
Mieloperoxidasa	P05164	-9.61	-17.96	0.031232
Tropomiosina 2	P07951	-0.98	4.09	0.032377
ARMEL	Q49AH0	1.91	10.94	0.032379
PKB beta	P31751	-0.495	-7.77	0.032379
I-309	P22362	-2.48	7.66	0.03356

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
GDF2	Q9UK05	-10.91	-21.82	0.033562
TrkA	P04629	-2.235	5.74	0.033562
PLXB2	015031	3.24	-3.7	0.03478
Proteinasa-3	P24158	-14.585	-26.62	0.034782
S100A7	P31151	1.06	-1.99	0.03604
ARGI1	P05089	-6.98	-19.27	0.037336
sCD163	Q86VB7	2.88	-4.88	0.037995
Adrenomedulina	P35318	1,22	-5,44	0,038672
MAPK14	Q16539	-0.58	-5.45	0.040046
TMA	P07202	-0.93	2.55	0.040048
Epo	P01588	18.195	1.25	0.041464
Anexina I	P04083	2,89	-12,32	0,042189
BPI	P17213	-20.905	-39.76	0.044429
Colectina renal 1	Q9BWP8	-1.64	-13.64	0.044429
IL-17F	Q96PD4	-1.62	4.93	0.044429
JAM-B	P57087	-0.86	6.48	0.044429
Integrina α V β 5	P06756, P18084	1.765	-5.42	0.045976
MP2K2	P36507	1.985	10.3	0.045976
SLIK1	Q96PX8	-0.975	5.51	0.045976
SP-D	P35247	-7.39	-30.86	0.045976
CD63	P08962	-1.285	4.6	0.048379
KEAP1	Q14145	-0.79	5.74	0.049202
Calgranulina B	P06702	-11,515	-28,5	0,049204

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
PSD7	P51665	1.45	-0.75	0.049204
RNasa H1	O60930	0.585	-4.06	0.049204
GNS	P15586	3.03	-6.64	0.049207

Tabla 3D. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría del estadio de fibrosis de CRN

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
GITR	Q9Y5U5	-1.84	-7.67	0.00178
Catepsina H	P09668	-3.02	-13.86	0.0038
DcR3	O95407	-2.01	1.1	0.005199
LAG-1	Q8NHW4	-4.56	-11.84	0.00619
PDXK	O00764	-2.82	-13.7	0.00766
RNasa H1	O60930	-2.6	2.2	0.007865
GP1BA	P07359	-4.35	1.52	0.009824
IL-1a	P01583	-0.12	-4.67	0.011627
GIB	P04054	2.12	-12.9	0.012548
Anhidrasa carbónica	II P00918	-2	4,59	0,01301
Caspasa-2	P42575	-2,27	2,84	0,015708
Cistatina-S	P01036	-1,78	3,35	0,016421
Troponina I, esquelética, de contracción rápida	P48788	6,48	-1,77	0,018398
IF4A3	P38919	-1.61	2.58	0.02063
PSMA	Q04609	1.42	-6.53	0.021352

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
Dtk	Q06418	2.32	-1.06	0.022546
LY9	Q9HBG7	3.6	-6.33	0.022975
MK13	015264	-4.33	0.54	0.024616
KI3L2	P43630	-1.21	1.92	0.024702
TrkC	Q16288	3.16	-4.72	0.026387
PCI	P05154	12.19	1.79	0.026539
TNFSF15	095150	2.31	-2.49	0.026539
Factor de coagulación IX	P00740	6,7	0,35	0,0275
MMP-3	P08254	12.69	2.97	0.027786
INGR2	P38484	-1	2.76	0.028756
C3a	P01024	-19.78	15.9	0.029511
LRP8	Q14114	1.37	-2.81	0.029511
17-beta-HSD 1	P14061	-4.14	2.16	0.029753
MP2K3	P46734	-3.46	-0.97	0.030562
CD70	P32970	-1.88	3.16	0.031303
CPNE1	Q99829	-4.36	2.87	0.031645
NEUREGULINA-1	Q02297	-0,69	6,86	0,031645
PCSK9	Q8NBP7	-2.85	8.12	0.031645
pTEN	P60484	-4.94	2.32	0.031645
K-ras	P01116	0.27	-3.79	0.033907
ATS15	Q8TE58	-0.15	4.2	0.036304
Efrina-A5	P52803	5,39	-0,13	0,036304
Endogлина	P17813	1.62	-3.86	0.037555

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
AFP	P02771	-0.39	1.07	0.037603
FTCD	O95954	-6.71	-42.29	0.037603
Granzima B	P10144	-1,2	2,74	0,038842
Activina RIB	P36896	-2,91	0,64	0,038856
TGF- β 3	P10600	-0.94	2.97	0.040146
DSC3	Q14574	1.23	6.37	0.040165
WFKN2	Q8TEU8	0.47	-2.98	0.042148
c-Myc	P01106	-2.91	0.18	0.043526
b-Endorfina	P01189	-0,56	2,33	0,043529
MICA	Q29983	1.73	-5.58	0.044362
ART	O00253	9.05	-1.82	0.04584
Ligando CD30	P32971	-0.44	-4.89	0.047903
GV	P39877	0.22	3.21	0.048664
CLC7A	Q9BXN2	-3.19	3.23	0.048918
IL-17D	Q8TAD2	0.85	-1.33	0.048918
KYNU	Q16719	-8.6	-26.22	0.048918
SLAF5	Q9UIB8	-4.04	-0.59	0.048918
SSRP1	Q08945	-1.51	-0.48	0.049438

[0080] Los marcadores se filtraron manualmente con sus actividades y otra información; las listas filtradas se presentan en las Tablas 4A-D de más abajo.

Tablas 4A-D: Marcadores proteicos para monitorizar las mejoras clínicas; filtrados**[0081]**

5 Tabla 4A. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejora de la esteatosis; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
Proteína similar a la nectina 2	Q9BY67
Ligando CD30	P32971
YKL-40	P36222
TSP2	P35442
PCSK7	Q16549
IR	P06213
AK1A1	P14550
FLRT3	Q9NZU0
TIMD3	Q8TDQ0
SAP	P02743
YES	P07947
CNTN2	Q02246
sTie-2	Q02763
Lumican	P51884
HSP 70	P0DMV8

Tabla 4B. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría de la inflamación lobular; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
ACE2	Q9BYF1
IL24	Q13007
ERAB	Q99714
Queratina 18	P05783
PHI	P06744

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
C4	P0C0L4, P0C0L5
CHST2	Q9Y4C5
Catepsina D	P07339
CBG	P08185
MDM2	Q00987
CD5L	O43866
IL-8	P10145
LYVE1	Q9Y5Y7
Eotaxina	P51671
Albúmina	P02768
Histona H2A.z	P0C0S5
KIF23	Q02241
ALT	P24298
EPO-R	P19235
STX1a	Q16623
MED-1	Q15648

Tabla 4C.

Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejoría del abombamiento hepático; filtrados (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt
Proteína C	P04070
LG3BP	Q08380
Catepsina D	P07339
Factor de coagulación Xa	P00742
Globulina fijadora de tiroxina	P05543
XEDAR	Q9HAV5

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
CBG	P08185
HGF	P14210
LTBP4	Q8N2S1
Eotaxina-2	000175
B7-H2	075144
JAG1	P78504
STAT3	P40763
VEGF sR2	P35968
Laminina	P25391, P07942, P11047
Topoisomerasa I	P11387
IGFBP-5	P24593
Cofactor II de heparina	P05546
Osteopontina	P10451
BAFF	Q9Y275
IL-13 Ra1	P78552
PH	P01298
EphA1	P21709
HINT1	P49773
Calicreína 12	Q9UKR0
M2-PK	P14618
Linfotoxina b R	P36941
C3	P01024
pTEN	P60484
Fucosiltransferasa 3	P21217
Mieloperoxidasa	P05164

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
Tropomiosina 2	P07951
ARMEL	Q49AH0
PKB beta	P31751
I-309	P22362
GDF2	Q9UK05
TrkA	P04629
PLXB2	015031
Proteinasa-3	P24158
S100A7	P31151
ARG11	P05089
sCD163	Q86VB7
Adrenomedulina	P35318
MAPK14	Q16539
TMA	P07202
Epo	P01588
Anexina I	P04083
BPI	P17213
IL-17F	Q96PD4
JAM-B	P57087
Integrina α V β 5	P06756, P18084
MP2K2	P36507
SLIK1	Q96PX8
SP-D	P35247
CD63	P08962
KEAP1	Q14145

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
Calgranulina B	P06702
PSD7	P51665
RNasa H1	O60930
GNS	P15586

Tabla 4D. Biomarcadores proteicos para monitorizar la mejora del estadio de fibrosis de CRN; filtrado

Nombre del marcador	UniProt
GITR	Q9Y5U5
Catepsina H	P09668
DcR3	O95407
LAG-1	Q8NHW4
PDXK	O00764
RNasa H1	O60930
GP1BA	P07359
IL-1a	P01583
GIB	P04054
Anhidrasa carbónica II	P00918
Caspasa-2	P42575
Cistatina-S	P01036
Troponina I, esquelética, contracción rápida	P48788
IF4A3	P38919
PSMA	Q04609
Dtk	Q06418
LY9	Q9HBG7
MK13	O15264

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
KI3L2	P43630
TrkC	Q16288
PCI	P05154
TNFSF15	095150
Factor de coagulación IX	P00740
MMP-3	P08254
INGR2	P38484
C3a	P01024
LRP8	Q14114
17-beta-HSD 1	P14061
MP2K3	P46734
CD70	P32970
CPNE1	Q99829
NEURREGULINA-1	Q02297
PCSK9	Q8NBP7
pTEN	P60484
K-ras	P01116
ATS15	Q8TE58
Efrina-A5	P52803
Endoglina	P17813
AFP	P02771
FTCD	O95954
Granzima B	P10144
Activina RIB	P36896
TGF-b3	P10600

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt
DSC3	Q14574
WFKN2	Q8TEU8
c-Myc	P01106
b-Endorfina	P01189
MICA	Q29983
ART	O00253
Ligando CD30	P32971
GV	P39877
CLC7A	Q9BXN2
IL-17D	Q8TAD2
SLAF5	Q9UIB8
SSRP1	Q08945

[0082] El análisis multivariante de los marcadores de monitorización también identifica unos pocos grupos de marcadores que, cuando se utilizan colectivamente, poseen mejores capacidades de monitorización. Estos grupos de marcadores multivariantes se enumeran en la Tabla B de más abajo.

Tabla B. Marcadores proteicos multivariantes para monitorizar el tratamiento

Criterio de valoración	Marcadores proteicos		Figura
Estadio de fibrosis de CRN	Marcador	(UniProt)	FIG. 4
	pTEN	(P60484)	
	CD70	(P32970)	
	Caspasa-2	(P42575)	
	Catepsina H	(P09668)	
	LAG-1	(Q8NHW4)	
	PDXK	(O00764)	
	GITR	(Q9Y5U5)	

(continuación)

Criterio de valoración	Marcadores proteicos	Figura
Esteatosis	Marcador (UniProt) Integrina $\alpha 1\beta 1$ (P56199, P05556) Proteína similar a la nectina 2 (Q9BY67) PDGF Rb (P09619) LRP8 (Q14114) Ligando CD30 (P32971) Lumican (P51884) SAP (P02743) YKL-40 (P36222) sTie-2 (Q02763) HSP 90a/b (P07900 P08238) TSP2 (P35442) YES (P07947)	FIG. 5
Inflamación lobular	Marcador (UniProt) HSP 90a/b (P07900 P08238) Aminoacilasa-1 (Q03154) FCG3B (075015) M-CSF R (P07333) Queratina 18 (P05783)	FIG. 6
Abombamiento hepático	Marcador (UniProt) Fibronectina (P02751) Globulina fijadora de tiroxina (P05543) FGF23 (Q9GZV9) LG3BP (Q08380) Cofactor de heparina II (P05546) Proteína C (P04070) STAT3 (P40763)	FIG. 7

[0083] En este ejemplo se identifican nuevos biomarcadores proteicos candidatos para la estadificación de la fibrosis, la esteatosis, la inflamación lobular y el abombamiento hepático en sujetos con EHNA mediante SOMAscan. Además, en sujetos con EHNA F2-3 tratados con selonsertib, también se identifican diversos marcadores que muestran características de monitorización de la respuesta al tratamiento.

Ejemplo 2. Los niveles séricos de ácidos biliares se regulan recíprocamente con los niveles de C4 en todo el espectro de gravedad de la enfermedad en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (no conforme a la invención)

[0084] Los perfiles de ácidos biliares (AB) séricos se alteran en pacientes con EHNA. Los datos que describen las asociaciones entre la composición de los AB y el estadio de fibrosis son limitados. Este ejemplo se llevó a cabo para: 1) caracterizar los AB circulantes y su intermediario, 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona (C4), en pacientes de todo el espectro de la EHNA y en controles sanos; y 2) determinar las asociaciones entre los AB séricos y el estadio de fibrosis en la EHNA.

Métodos:

[0085] Se cuantificaron los niveles séricos en ayunas de 15 AB en controles sanos (n = 118), EHNA F2/3 (n = 72) y cirrosis por EHNA (n = 29) mediante LC-MS/MS (Agilent 1290/Sciex, Metabolon). Se usó suero procedente de estudios clínicos de controles sanos en estudios farmacocinéticos del Compuesto A (un agonista selectivo no esteroideo del receptor farnesoide X), simtuzumab en fibrosis F2/3 y cirrosis. El análisis de los niveles séricos de AB de pacientes con cirrosis se realizó antes y después de la descompensación clínica. Se midieron los niveles séricos de C4 para mostrar la biosíntesis hepática de ácidos biliares. Se usó ANOVA unidireccional para evaluar las diferencias en los niveles de AB y C4 entre los grupos. Los datos se presentan como mediana (IQR).

Resultados:

[0086] Los niveles séricos totales de AB en ayunas en controles sanos fueron de 877ng/mL (582, 1298) y aumentaron de forma escalonada con la fibrosis progresiva: F2, 1483 (937, 2356); F3, 1825 (1226, 2848); F4, 12.161 (5614, 22.112). El aumento de ~14 veces de los AB séricos totales en la cirrosis de EHNA consistió principalmente en un aumento de los AB conjugados 11.518 (4737, 17.572) en comparación con la EHNA F2, 1141 (431, 1714). Los ácidos biliares conjugados primarios [glicocolato (GCA), taurocolato (TCA), glicodesoxicolato (GCDCA) y taurodesoxicolato (TCDCA)] fueron los principales compuestos de AB primarios elevados en EHNA F4 frente a EHNA F2. GCA y TCA fueron ~15 y 35 veces más altos, respectivamente, en F4 en comparación con F2.

[0087] La descompensación clínica de los sujetos con cirrosis de EHNA produjo una disminución de los niveles de AB, pero a niveles todavía ~10 veces superiores a los controles (Figura 8). Por el contrario, la síntesis de AB reflejada en los niveles séricos de C4 disminuyó con el desarrollo de la cirrosis y disminuyó aún más con la descompensación clínica (Figura 9). Los niveles de C4 en los pacientes F2/F3, 28,4 ng/mL (21,5, 54,1), fueron significativamente superiores a los de los controles, 17,4 (7,3, 30,0). El desarrollo de cirrosis dio lugar a niveles de C4 un 63% inferiores a los de los pacientes F2/F3, 10,5 (6,6, 32,8) y disminuyeron aún más con la descompensación clínica, 4,3 (1,3, 17,6).

[0088] En la EHNA F2/F3 se produce un aumento de los AB en general y de los AB primarios conjugados en comparación con los controles sanos, que va acompañado de niveles elevados de C4. En la cirrosis de EHNA, se produce un aumento pronunciado de los AB a pesar de que los niveles de C4 son inferiores a los encontrados en la EHNA F2/F3. Estos resultados indican que los mecanismos responsables de la homeostasis de los AB se pierden en la cirrosis, y se desregulan aún más con la descompensación clínica.

Ejemplo 3. Análisis de proteomas extracelulares y RNAseq para identificar biomarcadores no invasivos de fibrosis de EHNA

[0089] En este ejemplo se usó una combinación de análisis transcriptómicos derivados de biopsias de EHNA y algoritmos bioinformáticos predictivos para identificar 100 transcritos que podrían producir proteínas secretadas/filtradas (el denominado secretoma de EHNA). Estos transcritos mostraron perfiles de expresión dependientes del estadio de fibrosis y son relevantes para la biología de la EHNA. Los transcritos individuales o combinados son buenos discriminadores (AUROC > 0,86) para clasificar a los sujetos con EHNA con cirrosis (F4) o fibrosis grave (F3/F4).

[0090] Se seleccionaron y calificaron ensayos ELISA para los 30 candidatos principales. 11 proteínas (YKL-40, FAP, ITGB6, EMILIN1, FNDC1, IGDCC4, MASP2, SCF, LTBP2, ADAMTS12 y MCM2) mostraron una asociación significativa con la fibrosis de CRN en las muestras de F0-F4. FNDC1 y MCM2 (AUROC = 0,80 y 0,76, respectivamente) son buenos discriminadores de la fibrosis grave (F $\geq$ 3). Los cambios longitudinales de los 11 marcadores no están asociados con la mejoría o el empeoramiento de la fibrosis. Los cambios en YKL-40, FAP y SCF (AUROC = 0,70, 0,67 y 0,72, respectivamente) son buenos marcadores para monitorizar la mejoría de la esteatosis. Los niveles de referencia de FAP, SCF y LTBP2 son buenos marcadores (AUROC = 0,78, 0,71 y 0,70, respectivamente) para el pronóstico de la mejoría de la fibrosis en sujetos F4.

[0091] En el Ejemplo 1 se emplearon ensayos para dianas proteicas selectivas (LOXL2, Lumican, TGFBI, CK-18s, Pro-C3), y también una plataforma proteómica de alto contenido (SOMAscan), como parte de los métodos

proteómicos integrales para identificar y evaluar nuevos marcadores proteicos para la EHNA. A pesar de que estos dos métodos abarcaron aproximadamente 1350 proteínas, aún hay muchas proteínas circulantes potenciales que no están incluidas. Como método proteómico complementario, el análisis transcriptómico derivado de biopsias de la EHNA se combinó con algoritmos bioinformáticos predictivos para identificar otras proteínas secretadas/filtradas adicionales (denominadas secretoma de la EHNA) del hígado para su posterior exploración.

[0092] Las proteínas en circulación pueden proceder de 1) una "secreción clásica" a través de exocitosis, 2) una "secreción no clásica" a través de la translocación, la secreción lisosomal o los exosomas, o 3) las fugas tisulares debido a la muerte celular o los daños celulares.

[0093] A fin de predecir los cambios en las posibles proteínas circulantes, se utiliza la información transcriptómica de los tejidos de interés para predecir posibles proteínas secretadas o filtradas. En este ejemplo se desarrollaron algoritmos bioinformáticos para predecir genes que 1) demostraran una expresión diferencial dependiente del estadio de fibrosis en sujetos con EHNA y 2) codificaran proteínas secretadas. Estos secretomas de EHNA serán posibles candidatos selectivos de tejidos y posibles candidatos dependientes de la gravedad de la enfermedad como biomarcadores proteicos circulantes. Una vez identificados estos candidatos, se generaron datos de cuantificación de proteínas mediante ELISA o se obtuvieron de SOMAscan, si estaban disponibles.

Muestras

[0094] Para la extracción de ARN y RNAseq se utilizaron las muestras de hígado FFPE enumeradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Muestras obtenidas para RNAseq

	Sano	F1	F2	F3	F4
Fase 1: piloto (completada)	6*	4	14	11	1
Fase 2: segundo conjunto de datos (iniciada, los datos se esperan para mayo)	21	46	27	5	10
Total	27	50	41	16	11

Pruebas ELISA para los candidatos seleccionados

[0095] Las muestras de suero obtenidas se usaron para los experimentos iniciales de detección con ELISA a fin de identificar candidatos para pruebas posteriores que utilizan muestras de estudios clínicos.

Métodos bioinformáticos para la selección de candidatos

[0096] Se identificaron genes con evidencia experimental/MS de secreción en bases de datos y conjuntos de datos públicos. En conjunto, se identificaron unas 3886 proteínas secretadas o filtradas potenciales; las proteínas solapadas o únicas de cada conjunto de datos se ilustran en la Figura 10.

[0097] Después se compiló una lista de candidatos a biomarcadores circulantes no invasivos para la progresión de la EHNA usando datos de ARN-seq y bases de datos/conjuntos de datos públicos, usando para ello un flujo de trabajo bioinformático.

Flujo de trabajo experimental del secretoma de la EHNA

[0098] Se seleccionaron aproximadamente 100 genes tras los procedimientos de filtrado mencionados anteriormente. Estas proteínas secretadas, potenciales dependientes del estadio de fibrosis y selectivas para el hígado, se sometieron a validación experimental mediante SOMAscan (dependiendo de la disponibilidad) o pruebas ELISA (Figura 11).

Objetivos

[0099] Como método proteómico complementario, se emplearon algoritmos bioinformáticos para predecir las potenciales proteínas hepáticas secretadas/filtradas de los sujetos con EHNA. Los niveles circulantes de los candidatos prometedores se miden usando ensayos ELISA o bien SOMAscan (dependiendo de la disponibilidad) para examinar la relación entre: los niveles de estos marcadores proteicos y los estadios de fibrosis al inicio; los

[0101] Evaluar el *rendimiento* del panel de marcadores del secretoma para *monitorizar* los cambios de estadio de fibrosis de CRN.

5 **[0102]** Evaluar el *rendimiento* del panel de marcadores del secretoma para *pronosticar* los cambios de estadio de fibrosis de CRN (mejoría y empeoramiento).

[0103] Evaluar el *rendimiento* del panel de marcadores del secretoma para *monitorizar* la mejoría en los componentes de NAS (abombamiento hepático, inflamación lobular y esteatosis).

10 **[0104]** Evaluar el *rendimiento* del panel de marcadores del secretoma para *diagnosticar* EHNA versus no-EHNA en un conjunto de datos combinado de los estudios SEL1497, SIM 0105 y 0106, de manera que el no-EHNA se evalúa usando las siguientes cuatro definiciones: 1) 0 en cualquier subpuntuación de NAS (inflamación lobular, abombamiento hepático y esteatosis), 2) sin inflamación o con una inflamación leve ($NASLI \leq 1$), 3) sin abombamiento ($NASHB = 0$), 4) sin EHNA activa ($NASLI \leq 1$ y $NASHB = 0$).

Métodos estadísticos

20 **[0105]** Para calcular el AUROC de los criterios de valoración binarios, se usó el método de validación cruzada repetida. Más específicamente, los datos se dividen aleatoriamente en 5 grupos, de manera que se usan 4 de los grupos para el modelado (es decir, una regresión logística) y la predicción se realiza para el grupo restante, y de manera que se lleva a cabo el proceso de modelado/predicción para cada uno de los 5 grupos hasta que se obtienen las predicciones para los 5 grupos (es decir, todo el conjunto de datos). Se obtiene la métrica de rendimiento de AUROC. Después, el procedimiento de validación cruzada se repite 100 veces con 5 grupos diferentes divididos aleatoriamente cada vez, y se proporciona la media y el IC del 95% para el AUROC a lo largo de las 100 repeticiones. En el modelado, se usó la regresión logística para modelar el criterio de valoración binario (por ejemplo, F4 de referencia versus F0-3), con el biomarcador o biomarcadores como covariables.

30 **[0106]** Se proporcionan diversos análisis adicionales para el estadio de fibrosis de CRN inicial. En particular, se proporcionan diagramas de caja de los niveles iniciales en pruebas convencionales específicas según el estadio de fibrosis de CRN inicial. Se realizó la prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra para evaluar la tendencia (creciente o decreciente) de los niveles de biomarcadores según el estadio de la fibrosis.

Datos

35 **[0107]** Una vez aplicados los filtros bioinformáticos, se generaron 100 genes candidatos del secretoma de la EHNA. Entre estos 100 objetivos, muchos codifican proteínas que tienen funciones relacionadas con la biología de la EHNA (Tabla 6).

40 Tabla 6. Los candidatos del secretoma participan en vías biológicas relevantes para la EHNA

ECM	Receptores de membrana	Relacionado con la miosina y el citoesqueleto	Neuroendocrino	Inmunoglobulina en cito/quimioquina	Relacionados con plaquetas/complemento	Enzima/TF	Otros
Col1A1	EPHA3	MYH10	TENM4	IGDCC4	THBS2	PLCE1	FAM129B
Co13A1	EPHB2	MYO5A	SYTL2	IGSF3	C4BPB	FUBP1	FNDC1
Co14A1	FGFR2	TPM1	TANC1	PRTG	C4BPA	AEBP1	HPX
Co14A2	FGFR3	LIMA1	NEO1	SCF	MASP2	ZNF671	GC
Co15A1	DDR1	CALD1	ROBO1	CCL14	TFPI	PTGDS	AGT
Co16A3	TLR7	PGDN	UNC5B			ZNF101	CPN2

(continuación)

5	ECM	Receptores de membrana	Relacionado con la miosina y el citoesqueleto	Neuroendocrino	Inmunoglobulina en cito/quimioquina	Relacionados con plaquetas/complemento	Enzima/TF	Otros
10	Col14A1	LTBP2	SPTAN1	THY1			LUZP1	<u>CLEC3B</u>
	CHI3L1	MRC2	KIF23	NAV3			ATP5J2	<u>APOC3</u>
15	LOXL1	ITGB6	DPYSL3	PCLO			FAP	<u>APOH</u>
	LAMC2	<u>MARCO</u>	TNS3	LRRC4B			<u>CPB2</u>	<u>APCS</u>
20	EMILIN1	<u>LYVE1</u>	UTRN	CADPS			<u>ALDH6A1</u>	
	CDH6			AHNAK			<u>PCBD1</u>	
25	PCDH18						<u>PRDX6</u>	
	ADAMTS L 2						<u>PON3</u>	
30	ADAMS1 2						<u>SMPDL3A</u>	
35	AGRN						<u>GLO1</u>	
	DNAH7						<u>PSMB2</u>	
40	CCDC80						<u>CTH</u>	
	YKL-40						<u>MOCS2</u>	
45	<u>FCN3</u>						<u>SERPINF2</u>	
	<u>FCN2</u>						<u>KIAA1161</u>	
50	* en negrita y subrayado: los niveles disminuyeron con el aumento del estadio de fibrosis; en caso contrario, los niveles disminuyeron con el aumento del estadio de fibrosis.							

55 **[0108]** Después, en este ejemplo se realizaron diversos análisis para determinar si las expresiones hepáticas de estos genes se pueden usar como clasificadores para la fibrosis grave y/o la cirrosis. Se observó que tanto los genes individuales (FAP o CDH6) como los genes combinados (panel de 15 para F3, panel de 5 para F4) son buenos clasificadores para la fibrosis grave o la cirrosis (Figura 12).

60 **[0109]** No obstante, utilizar ARN hepático como biomarcador de la EHNA no resulta práctico; así, los niveles de proteínas circulantes de estos candidatos se analizan más a fondo para ser candidatos para marcadores de diagnóstico y/o monitorización de enfermedad para la fibrosis de la EHNA.

65 **[0110]** Se usaron dos métodos para generar datos de proteínas circulantes para los candidatos de secretoma

seleccionados: SOMAscan y ELISA.

1. SOMAscan

5 **[0111]** Hay 23 candidatos de secretoma incluidos en la plataforma SOMAscan.

Tabla 7. Candidatos de secretoma incluidos en SOMAscan

10	Proteína	Gen	Nombre completo
	TSP2	THBS2	Trombospondina
15	MRC2	MRC2	Receptor de manosa tipo C 2
	SAP	APCS	Componente P amiloide sérico
20	EPHB2	EPHB2	Receptor 2 de efrina de tipo B
	SPTA2	SPTAN1	Cadena alfa de espectrina, no eritrocítica 1
25	A2AP	SERPINF2	Alfa 2-antiplasmina
	CDH6	CDH6	Cadherina-6
30	CCDC80 (URB)	CCDC80	Proteína 80 que contiene dominios en espiral
	CCL14 (HCC-1)	CCL14	Quimiocina 14 con motivo C-C
35	CPB2 (TAFI)	CPB2	Carboxipeptidasa B2
	DDR1	DDR1	Receptor epitelial 1 con dominio de discoidina
40	EPHA3	EPHA3	Receptor 3 de efrina tipo A
	FCN2	FCN2	Ficolina-2
	FCN3	FCN3	Ficolina-3
45	FGFR2	FGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos
	FGFR3	FGFR3	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos
50	HPX	HPX	Hemopexina
	KIF23	KIF23	Miembro de la familia de kinesina 23 proporcionado
55	LYVE1	LYVE1	Receptor 1 del ácido hialurónico endotelial de los vasos linfáticos
	PRDX6	PRDX6	Peroxiredoxina 6
60	ASM3A	SMPDL3A	Fosfodiesterasa 3a similar a la esfingomielinasa ácida
	TPM1	TPM1	Cadena alfa de tropomiosina 1
	TFPI	TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular

Los niveles circulantes de las proteínas codificadas para estos 23 genes se examinaron a partir del conjunto de datos lógicos SOMA del ejemplo 1 y se descubrió que:

- TSP2, MRC2, SAP, EPHB2, SPTA2 y SEPR se asociaron significativamente ($p < 0,05$) con el estadio de fibrosis de CRN.

- 5 - No se identificaron asociaciones significativas entre los cambios en estos marcadores y las mejoras en el estadio de fibrosis; no obstante, el cambio en A2AP mostró características potenciales de monitorización de la enfermedad.
- Los cambios en TSP2, MRC2, SAP, EPHB2, HPX y LYVE1 se asociaron con la mejora de la esteatosis (Tabla 8).

10 Tabla 8. Cambios en los marcadores candidatos del secretoma con las mejoras en la fibrosis o en los componentes de NAS en el conjunto de datos de SOMAscan (1497; al inicio/en la semana 24)

	Fibrosis	Esteatosis	LI	HB
THBS2(TSP2)	P=0.47	P<0.001	P<0.05	P=0.085
MRC2	P=0.84	P<0.05	P=0.67	P=0.41
APCS(SAP)	P=0.44	P<0.001	P=0.25	P=0.63
EPHB2	P=0.62	P<0.05	P=0.66	P=0.67
CPB2(TAFI)	P=0.52	P=0.59	P<0.05	P=0.55
DDR1 (receptor de dominio de discoidina 1)	P = 0,51	P = 0,63 P	< 0,05 P	= 0,87
HPX (hemopexina)	P=0.72	P<0.005	P=0.28	P=0.24
KIF23	P=0.14	P=0.30	P<0.01	P=0.93
LYVE1	P=0.41	P<0.005	P<0.01	P=0.38

40 2. Ensayos ELISA

[0112] Se desarrollaron y se calificaron ensayos ELISA para candidatos del secretoma que no estaban incluidos en el SOMAscan (ITGB6, FNDC1, MCM2, EMILIN1, IGDC4, MASP2, SCF, LTBP2, ADAMTS12), y también para aquellos (TSP2, A2AP, MRC2, SAP, CTSH, IGFBP7, C7, MAC2BP) que estaban en la plataforma SOMAscan y demostraron resultados preliminares prometedores en las asociaciones de estadificación de la fibrosis (Tabla 9).

Tabla 9. Ensayos ELISA desarrollados para candidatos a secretoma

Proteína	Gen	Nombre Completo	Función biológica
CHI3L1 (YKL-40)	CHI3L1	Proteína 1 similar a la quitinasa-3	Glicoproteína de la matriz extracelular
FAP	FAP	Proteína de activación de fibroblastos	Proteasa unida a membrana
ITGB6	ITGB6	Integrina, beta 6	Receptor de membrana
FNDC1	FNDC1	Dominio de fibronectina tipo III que contiene 1	Señalización de proteína G

(continuación)

Proteína	Gen	Nombre Completo	Función biológica
MCM2	MCM2	Proteína de mantenimiento de minicromosomas 2	Replicación del genoma/ regeneración hepática
EMILIN1	EMILIN1	Interfaz de microfibrillas de elastina 1	Glicoproteína de la matriz extracelular
IGDCC4	IGDCC4	Miembro 4 de la subclase DCC de la superfamilia de inmunoglobulinas	Inmunoglobulina
MASP2	MASP2	Lectina serina proteasa 2 que se une a manano	Proteasa para escindir el complemento (C4/C2)
SCF(Kit de ligando)	KITLG	Kit ligando	Citocina
LTBP2	LTBP2	Proteína de unión al factor de crecimiento transformante latente beta 2	ECM; se une al TGF
ADAMTS12	ADAMTS12	Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 12	Proteasa extracelular; promueve la fibrogénesis
TSP2	THBS2	Trombospondina-2;	Glicoproteína; media las interacciones entre células y entre células y matrices
A2AP	SERPINF2	Alfa 2-antiplasmina	Inhibidor de la serina proteasa
MRC2	MRC2	Receptor de manosa tipo C 2	Receptor endocítico; internaliza ligandos glicosilados
SAP	APCS	Componente P amiloide sérico	Proteínas de fase aguda (APP)
CTSH	CTSH	Catepsina H	Cisteína proteinasa lisosomal
IGFBP7	IGFBP7	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7	Controla la disponibilidad de IGF para los tejidos y las células
C7	C7	Complemento C7	Glicoproteína sérica, componente del complejo del complemento
MAC2BP	LGALS3BP	Proteína de unión a galectina-3	Modula las interacciones célula-célula y célula-matriz

Resultados

Asociación de los candidatos circulantes del secretoma con los estadios de fibrosis

[0113] Los ensayos ELISA se realizaron por lotes; se probaron los primeros 11 candidatos (CHI3L1, FAP, ITGB6, FNDC1, MCM2, EMILIN1, IGDCC4, MASP2, SCF, LTBP2, ADAMTS12) y 6 de los 11 candidatos demostraron una asociación significativa con el estadio de fibrosis (Figura 13).

[0114] Debido a la limitación en 1497 muestras de estudio, se examinaron 8 candidatos de secretoma adicionales (TSP2, A2AP, MRC2, SAP, CTSH, IGFBP7, C7, MAC2BP) usando muestras adicionales tanto al inicio como en la semana 48. 5 de 8 candidatos demostraron una asociación significativa con el estadio de fibrosis, incluidos TSP2, A2AP, SAP, IGFBP7 y C7.

[0115] Estos resultados mostraron que el algoritmo bioinformático predictivo desarrollado aquí identificó con éxito potenciales proteínas hepáticas secretadas/fugadas que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad EHNA y que podrían tener potencial para diagnosticar y monitorizar la fibrosis en la EHNA.

Diagnóstico del estadio de fibrosis de CRN (fibrosis avanzada [F3, 4] y cirrosis [F4])

[0116] Para evaluar el rendimiento de estas novedosas proteínas candidatas en la estadificación de la fibrosis en sujetos con EHNA, se usaron análisis univariantes y multivariantes para identificar los marcadores individuales o los conjuntos de marcadores que pueden clasificar a los sujetos con fibrosis avanzada ($F \geq 3$) o con cirrosis, de manera que los resultados se resumen a continuación.

[0117] Se observó un AUROC de $\geq 0,7$ para el diagnóstico de fibrosis avanzada para IGFBP7 y TSP2, y para el diagnóstico de cirrosis para SAP, A2AP e IGFBP7, utilizando los datos *de referencia* y los de la *semana 48* [Tabla 16.8.2.1]. C7 tuvo una AUROC de 0,65 para el diagnóstico de cirrosis.

[0118] Se observaron diferencias en el AUROC para el diagnóstico de la fibrosis avanzada inicial y la cirrosis avanzada inicial usando los datos *de referencia* y los de *fallo de cribado*, y los datos *de referencia*, los de *fallo de cribado* y los de la *semana 48*, debido al pequeño tamaño de la muestra en F0-2 en cuanto a los datos *de referencia* y los de *fallo de cribado* (Tabla 10).

Tabla 10. Evaluación del panel del secretoma para el diagnóstico de la fibrosis avanzada inicial (F3-4 versus F0-2) y la cirrosis (F4 versus F0-3) en datos de pacientes inscritos, pacientes que no pasaron la prueba de cribado y de la semana 48 (datos de estudios combinados)

Prueba	AUC (IC 95%)*						
	BL + SF (3 estudios) F3, 4 vs.F0, 1, 2	BL + SF (3 estudios) F4 vs. F0, 1, 2,3	Semana 24 (1497) F3 vs. F1, 2	Sem. 48 (105/106) F3, 4 vs. F0, 1, 2	Sem. 48 (105/106) F4 vs. F0, 1, 2, 3	BL/SF + Sem. 48 (3 estudios)** F3, 4 vs. F0, 1, 2	BL/SF + Sem. 48 (3 estudios)** F4 vs. F0, 1, 2, 3
ADAMTS12	0.54 (0.49, 0.57)	0.53 (0.49, 0.55)	0.52 (0.47, 0.62)	0.58 (0.52, 0.65)	0.53 (0.48, 0.55)	0.51 (0.48, 0.55)	0.54 (0.52, 0.55)
CHI3L1	0.66 (0.64, 0.68)	0.55 (0.49, 0.57)	0.52 (0.47, 0.59)	0.59 (0.56, 0.62)	0.63 (0.61, 0.64)	0.63 (0.6, 0.64)	0.6 (0.59, 0.61)

(continuación)

Prueba	AUC (IC 95%)*						
	BL + SF (3 estudios) F3, 4 vs.F0, 1, 2	BL + SF (3 estudios) F4 vs. F0, 1, 2,3	Semana 24 (1497) F3 vs. F1, 2	Sem. 48 (105/106) F3, 4 vs. F0, 1, 2	Sem. 48 (105/106) F4 vs. F0, 1, 2, 3	BL/SF + Sem. 48 (3 estudios)* *F3, 4 vs. F0, 1, 2	BL/SF + Sem. 48 (3 estudios)* * F4 vs. F0, 1, 2, 3
EMILIN1	0.53 (0.45, 0.58)	0.62 (0.61, 0.62)	0.58 (0.44, 0.67)	0.59 (0.57, 0.61)	0.56 (0.54, 0.57)	0.57 (0.54, 0.59)	0.6 (0.59, 0.6)
FAP	0.55 (0.48, 0.6)	0.51 (0.48, 0.57)	0.66 (0.63, 0.68)	0.64 (0.62, 0.65)	0.71 (0.69, 0.71)	0.54 (0.51, 0.56)	0.58 (0.57, 0.58)
FNDC1	0.81 (0.8, 0.81)	0.57 (0.51, 0.59)	0.58 (0.56, 0.61)	0.58 (0.48, 0.66)	0.54 (0.47, 0.61)	0.56 (0.53, 0.59)	0.55 (0.52, 0.57)
IGDCC4	0.57 (0.54, 0.62)	0.52 (0.48, 0.58)	0.6 (0.51, 0.69)	0.53 (0.47, 0.58)	0.52 (0.47, 0.56)	0.51 (0.48, 0.56)	0.52 (0.48, 0.55)
ITGB6	0.56 (0.48, 0.68)	0.54 (0.5, 0.57)	0.55 (0.46, 0.67)	0.51 (0.44, 0.55)	0.57 (0.54, 0.59)	0.52 (0.48, 0.59)	0.56 (0.54, 0.57)
MASP2	0.59 (0.56, 0.65)	0.53 (0.48, 0.58)	0.59 (0.47, 0.69)	0.53 (0.48, 0.58)	0.52 (0.48, 0.56)	0.52 (0.49, 0.57)	0.52 (0.49, 0.55)
SCF	0.55 (0.47, 0.64)	0.63 (0.62, 0.64)	0.55 (0.46, 0.66)	0.59 (0.5, 0.66)	0.6 (0.57, 0.61)	0.57 (0.52, 0.63)	0.63 (0.62, 0.63)
LTBP2	0.62 (0.6, 0.63)	0.65 (0.63, 0.67)	0.59 (0.53, 0.63)	0.53 (0.47, 0.59)	0.54 (0.48, 0.61)	0.58 (0.53, 0.61)	0.53 (0.48, 0.58)
MCM2	0.76 (0.74, 0.77)	0.58 (0.56, 0.59)	0.52 (0.45, 0.64)	0.51 (0.48, 0.56)	0.56 (0.54, 0.58)	0.57 (0.55, 0.58)	0.59 (0.58, 0.59)
FNDC1 + MCM2	0.84 (0.83, 0.86)	0.6 (0.57, 0.61)	0.54 (0.43, 0.61)	0.55 (0.51, 0.6)	0.53 (0.47, 0.56)	0.57 (0.55, 0.59)	0.59 (0.58, 0.6)
FNDC1 + MCM2 + BA + NFS	0.86 (0.83, 0.87)	0.77 (0.75, 0.78)	0.65 (0.59, 0.7)	0.78 (0.75, 0.8)	0.8 (0.77, 0.82)	0.72 (0.7, 0.74)	0.8 (0.79, 0.81)

Prueba	AUC (IC 95%)*						
	BL F3, 4 vs. F2	BL F4 vs. F3	Sem.24 (1497) F3 vs. F1, 2			BL+Sem.48 F3, 4 vs. F0, 1, 2	BL+Sem.48 F4 vs. F0, 1, 2, 3
TSP2		0.63 (0.61, 0.64)		0.7 (0.69, 0.72)	0.71 (0.7, 0.72)	0.71 (0.69, 0.72)	0.67 (0.66, 0.67)
A2AP		0.71 (0.7, 0.72)		0.67 (0.65, 0.68)	0.72 (0.71, 0.72)	0.66 (0.64, 0.66)	0.71 (0.71, 0.72)

(continuación)

Prueba	AUC (IC 95%)*						
	BL F3, 4 vs. F2	BL F4 vs. F3	Sem.24 (1497) F3 vs. F1, 2			BL+Sem48 F3, 4 vs. F0, 1, 2	BL+Sem48 F4 vs. F0, 1, 2, 3
MRC2		0.58 (0.47, 0.65)		0.59 (0.47, 0.65)	0.52 (0.47, 0.58)	0.58 (0.47, 0.65)	0.52 (0.47, 0.58)
SAP		0.78 (0.77, 0.78)		0.62 (0.59, 0.63)	0.77 (0.76, 0.77)	0.59 (0.56, 0.61)	0.77 (0.77, 0.78)
CTSH		0.5 (0.48, 0.53)		0.55 (0.52, 0.58)	0.52 (0.43, 0.57)	0.52 (0.47, 0.55)	0.51 (0.46, 0.55)
IGFBP7		0.63 (0.6, 0.64)		0.76 (0.75, 0.77)	0.78 (0.77, 0.78)	0.75 (0.74, 0.76)	0.71 (0.7, 0.71)
C7		0.72 (0.71, 0.73)		0.54 (0.5, 0.56)	0.56 (0.53, 0.57)	0.53 (0.49, 0.58)	0.65 (0.64, 0.65)
MAC2BP		0.54 (0.49, 0.59)		0.6 (0.58, 0.62)	0.61 (0.59, 0.62)	0.59 (0.56, 0.61)	0.55 (0.53, 0.56)
* Indica la media y el correspondiente IC del 95 % para una validación cruzada de 5 grupos repetida 100 veces. ** BL/SF de los 3 estudios, pero los valores de la semana 48 sólo de SIM 105/106 (analizando todos los datos juntos).							

Monitorización del cambio de estadio de la fibrosis de CRN (mejora o empeoramiento)

[0119] Después, en este ejemplo se examinaron los cambios longitudinales de estos nuevos marcadores proteicos y se comprobó si estos marcadores pueden tener valores potenciales para monitorizar los cambios en el estadio de la fibrosis; los resultados se resumen más adelante.

[0120] Usando sólo el *porcentaje (%) de cambio respecto al inicio* como predictor, varios marcadores tienen un AUROC de 0,60-0,70 para monitorizar los cambios en el estadio de la fibrosis, pero ninguno de los marcadores del panel del secretoma tiene un rendimiento de AUROC $\geq 0,7$ para *monitorizar* la mejora de la fibrosis de CRN o el empeoramiento de la fibrosis de CRN.

[0121] En general, el rendimiento del AUROC mejora cuando se usan como predictores *tanto el valor de referencia inicial como el porcentaje (%) de cambio con respecto al valor de referencia inicial* en comparación con el uso exclusivo del cambio con respecto al valor de referencia inicial. FAP, LTBP2, SAP, IGFBP7 y MAC2BP tienen un AUROC $> 0,70$ para *monitorizar* la mejora de la fibrosis de CRN o el empeoramiento de la fibrosis de CRN (SIM 105).

Pronóstico del cambio de estadio de la fibrosis de CRN (mejora o empeoramiento en la semana 48) usando los niveles iniciales de biomarcadores

[0122] Este ejemplo también llevó a cabo un análisis para comprobar si los niveles iniciales de estos marcadores tienen valores de pronóstico para predecir cambios en el estadio de la fibrosis en la semana 48 en muestras de estudio SIM, ya que estos estudios se consideran una progresión natural debido a la falta de eficacia de SIM. Los resultados se resumen más adelante.

[0123] Diversos marcadores (usando los niveles de referencia iniciales) tienen un rendimiento de AUROC $\geq 0,7$ para *predecir*.

[0124] Mejora de la fibrosis de CRN: IGFBP7 (F3 a menos en la semana 48 en SIM105, F4 a menos en la semana 48 en SIM106, F4/3 a menos en la semana 48), FAP y SCF (F4 a menos en la semana 48).

[0125] Empeoramiento de la fibrosis de CRN (F3 a F4 en la semana 48): IGFBP7 y SAP.

Monitorización de los cambios (mejora o empeoramiento) en los componentes de la puntuación NAS (no conforme a la invención)

5 [0126] Usando como predictor el % de cambio con respecto al valor inicial de referencia, varios marcadores tienen un AUROC de 0,60-0,70 para *monitorizar* la mejora en el componente de NAS (abombamiento hepático, inflamación lobular o esteatosis).

10 [0127] En general, el rendimiento del AUROC para *monitorizar* la mejoría en el componente de NAS mejora cuando se usan como predictores *tanto el valor inicial como el cambio con respecto al valor inicial*. Se observó un AUROC $\geq 0,7$ para FAP para monitorizar la mejora de la inflamación lobular (Grado 3 a menos en la semana 48), y ADAMTS 12 para monitorizar la mejora de la esteatosis (Grado 2/3 a menos en la semana 48).

15 **Diagnóstico de EHNA vs. no EHNA en los estudios SEL 1497, SIM 0105 y 0106 (no conforme a la invención)**

[0128] Usando los datos de referencia iniciales y de la semana 48, el TSP2 tuvo un AUROC de 0,66/0,68/0,7/0,71 para *diagnosticar* EHNA vs. no EHNA [4 definiciones de no EHNA: 1) 0 para cualquier subpuntuación de NAS (inflamación lobular, abombamiento hepático o esteatosis); 2) sin inflamación o con inflamación leve; 3) sin abombamiento; 4) sin EHNA activa (sin inflamación o con inflamación leve y sin abombamiento)]. Se observó un AUROC similar cuando se usaron únicamente los datos de referencia iniciales de los pacientes incluidos en los estudios combinados SIM105/106.

Conclusiones

25 [0129] En este ejemplo se adoptó un nuevo enfoque para generar potenciales biomarcadores proteicos selectivos del hígado y dependientes del estadio de fibrosis utilizando datos transcriptómicos derivados de biopsias y algoritmos bioinformáticos para predecir las proteínas secretadas/fugadas. Esta estrategia demostró ser fructífera y arrojó los siguientes hallazgos clave: (1) los genes candidatos codifican proteínas implicadas en la biología de la fibrosis; (2) los perfiles de expresión hepática de estos genes (panel único o selectivo) tienen buenas características de clasificación (AUROC de 0,8-0,9) para la identificación de fibrosis graves (F3) o cirrosis (F4); y (3) los niveles circulantes de los candidatos selectivos se evaluaron mediante SOMAscan (dependiendo de la disponibilidad) o ensayos ELISA.

35 [0130] Se observó un AUROC $\geq 0,7$ para diagnosticar una fibrosis avanzada en el caso de IGFBP7 y TSP2, y para diagnosticar una cirrosis en el caso de SAP, A2AP e IGFBP7 utilizando los *datos de referencia iniciales, de fallo de cribado y de la semana 48*. C7 tuvo un AUROC de 0,65 para el diagnóstico de cirrosis.

40 [0131] Ninguno de los marcadores del panel del secretoma (usando el % de cambio con respecto al valor de referencia inicial) tuvo un AUROC $\geq 0,7$ para monitorizar los cambios de la fibrosis de CRN (mejoría o empeoramiento) y la mejoría en el componente de NAS (abombamiento hepático, inflamación lobular y esteatosis). En general, el rendimiento de AUROC mejora cuando se utiliza *tanto el valor de referencia inicial como el % de cambio con respecto al valor de referencia inicial*.

45 [0132] Usando los *niveles de referencia iniciales*, diversos marcadores tenían un AUROC $\geq 0,7$ para predecir:

La mejora de la fibrosis de CRN: IGFBP7 (F3 a menos en la semana 48, F4 a menos en la semana 48, F4/3 a menos en la semana 48), FAP y SCF (F4 a menos en la semana 48); y

50 El empeoramiento de la fibrosis (de F3 a F4 en la semana 48): IGFBP7 y SAP.

[0133] Usando los datos de referencia iniciales y los de la semana 48 en los estudios SIM105/106 combinados, el TSP2 tuvo un AUROC de $\sim 0,7$ para *diagnosticar* EHNA vs. no EHNA en las 4 definiciones.

55 **Ejemplo 4. Datos adicionales de SOMAscan para GDF-15 y CD163 (no conforme a la invención)**

[0134] Este ejemplo reporta datos adicionales de SOMAscan (recopilados con el método del Ejemplo 1) para las proteínas circulantes GDF-15 y CD163. Los datos resumidos se presentan en los gráficos de las Figuras 14-18.

60 [0135] Tal y como se muestra en la FIG. 14, los niveles circulantes de GDF-15 se asociaron significativamente con la etapa de fibrosis en sujetos con EHNA; $p < 0,0001$ (prueba de Kruskal-Wallis). Asimismo, tal y como se muestra en la FIG. 15, los niveles circulantes de GDF-15 se asociaron significativamente con la inflamación lobular (panel izquierdo; $p < 0,05$ (prueba de Kruskal-Wallis)) y el abombamiento hepático en los sujetos con EHNA (panel derecho; $p < 0,005$ (prueba de Kruskal-Wallis)). Sin embargo, los niveles circulantes de GDF-15 no se asociaron con la esteatosis o las puntuaciones de NAS en los sujetos con EHNA.

[0136] El gráfico de la FIG. 16 muestra que los niveles circulantes de CD163 se asociaron significativamente con los estadios de fibrosis en sujetos con EHNA, $p < 0,001$ (prueba de Kruskal-Wallis). Los niveles circulantes de CD163 también se asociaron significativamente con la inflamación lobular (FIG. 17, panel izquierdo, $p < 0,0005$ (prueba de Kruskal-Wallis)) y el abombamiento hepático (FIG. 17, panel derecho, $p < 0,0001$ (prueba de Kruskal-Wallis)) en los sujetos con EHNA. Los niveles circulantes de CD163 también se asociaron significativamente con las puntuaciones de NAS (FIG. 18, $p < 0,001$ (prueba de Kruskal-Wallis)), pero no con la esteatosis en los sujetos con EHNA.

[0137] Los resultados de los Ejemplos 3 y 4 se resumen en las siguientes tablas, complementarias a las Tablas 1-4.

Tablas 11A-D: Marcadores proteicos para el diagnóstico

[0138]

Tabla 11A. Marcadores proteicos para los estadios de fibrosis de CRN (CRN)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de fibrosis de CRN 0	Estadio de fibrosis de CRN 1	Estadio de fibrosis de CRN 2	Estadio de fibrosis de CRN 3	Estadio de fibrosis de CRN 4
YKL-40	P36222	<0.01	N/A	N/A	63100	124716	129864
FAP	Q12884	0.606	N/A	N/A	50761	44068	44705
ITGB6	P18564	0.202	N/A	N/A	14.5	14.0	17.1
EMILIN1	Q9Y6C2	<0.005	N/A	N/A	16802	16818	14941
FND1	Q4ZHG4	<0.0005	N/A	N/A	0.4	1.0	1.2
IGDCC4	Q8TDY8	0.076	N/A	N/A	321.2	274.1	262
MASP2	000187	0.127	N/A	N/A	718.8	579.5	591.8
SCF	P21583	<0.005	N/A	N/A	732.3	693.7	798.8
LTBP2	Q14767	<0.0005	N/A	N/A	1.5	1.9	2.6
ADAMTS12	P58397	0.199	N/A	N/A	15825.8	19191	25317.7
MCM2	P49736	<0.0005	N/A	N/A	12.1	16.1	18.1
GDF-15	Q99988	<0.0001	569.4	657	917	1046	1247
CD163	Q86VB7	<0.001	2027	2190	2615	2746	3265

Tabla 11B. Marcadores proteicos para puntuaciones de NAS (NAS) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadios de Nas							
CD163	Q86VB7	<0.001	2429	1943	2363	2258	2676	2817	2918	3033

Tabla 11C. Marcadores proteicos de inflamación lobular (IL) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de inflamación lobular 0	Estadio de inflamación lobular 1	Estadio de inflamación lobular 2
GDF-15	Q99988	<0.05	623.2	858.6	1024
CD163	Q86VB7	<0.001	2002	2413	2846

Tabla 11D. Marcadores proteicos de abombamiento hepático (HB) (no conforme a la invención)

Nombre del marcador	UniProt	Valor de p	Estadio de abombamiento hepático 0	Estadio de abombamiento hepático 1	Estadio de abombamiento hepático 2
GDF-15	Q99988	<0.005	630.9	774.7	1039
CD163	Q86VB7	<0.0001	1966	2473	2863

Tabla 12: Marcadores proteicos para monitorizar las mejoras clínicas (no conforme a la invención)

[0139]

Tabla 12. Biomarcadores proteicos para monitorizar las mejoras en los criterios de valoración clínicos relacionados con la EHNA

Nombre del marcador	UniProt	Criterios de valoración clínicos	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
YKL-40	P36222	Puntuación de NAS	0.5	-23.9	<0.05
YKL-40	P36222	Esteatosis	10.8	-22.9	<0.05
FAP	Q12884	Esteatosis	2.4	-6.2	<0.05
MCM2	P49736	Esteatosis	4.3	-11.8	0.08
SCF	P21583	Abombamiento	1.9	7.4	<0.05
YKL-40	P36222	Inflamación	4.3	-22	<0.05
FAP	Q12884	Inflamación	1.5	-12.6	<0.05
MCM2	P49736	MRE	4.3	-7.9	0.06
YKL-40	P36222	MRIPDFF	6.5	-22	<0.05

(continuación)

Nombre del marcador	UniProt	Criterios de valoración clínicos	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que no mejoran	Porcentaje medio de CHG en la semana 24 en personas que mejoran	Valor de p
EMILIN1	Q9Y6C2	MRIPDFF	-2.8	-16.6	<0.05
FAP	Q12884	MRIPDFF	1.2	-17.5	<0.05

Ejemplo 5. Los algoritmos que utilizan pruebas no invasivas pueden identificar con precisión a los pacientes con fibrosis avanzada debida a la EHNA: datos de los ensayos clínicos STELLAR (no conforme a la invención)

[0140] Existe una gran necesidad -no cubierta- de pruebas no invasivas (NIT), precisas y fácilmente disponibles para identificar a los pacientes con fibrosis avanzada (F3-F4) debida a la EHNA. El objetivo de este ejemplo era evaluar las NIT secuenciales para minimizar la necesidad de realizar biopsias y mejorar la precisión en el uso de pruebas individuales.

[0141] Métodos: En los estudios STELLAR (NCT03053050 y NCT03053063) se inscribieron pacientes con EHNA con fibrosis en puente (F3) o cirrosis compensada (F4). Las biopsias hepáticas de referencia se leyeron de forma centralizada utilizando la clasificación de fibrosis de EHNA de la CRN y se midieron diversos marcadores de fibrosis no invasivos, incluidos el índice de Fibrosis-4 (FIB-4), la prueba de Fibrosis Hepática Mejorada (ELF) y FibroScan® (FS). El rendimiento de estas pruebas para discriminar la fibrosis avanzada se evaluó mediante AUROC con una validación cruzada x5 repetida 100 veces. Los umbrales se obtuvieron maximizando la especificidad, dado $\geq 85\%$ de sensibilidad (y viceversa). La cohorte se dividió (80%/20%) en conjuntos de evaluación/validación. El conjunto de evaluación se estratificó 250 veces más en conjuntos de entrenamiento y prueba (66%/33%). Los umbrales óptimos se derivaron como el promedio entre los conjuntos de entrenamiento y se aplicaron secuencialmente (FIB-4 seguido de ELF y/o FS) al conjunto de validación.

[0142] Resultados: Todos los pacientes cribados e inscritos con histología hepática (N=3202, 71% F3-F4) y resultados de NIT disponibles se incluyeron en el análisis. Utilizando los umbrales derivados de los datos del estudio STELLAR, la prueba FIB-4 seguida de la prueba FS o ELF en aquellos con valores de FIB-4 indeterminados (1,23 a 2,1) demostró unas buenas características de rendimiento al tiempo que minimizaba la frecuencia de valores indeterminados hasta un 13% (ver Tabla). El uso de los umbrales de NIT publicados arrojó unos hallazgos similares (datos no mostrados). La adición de una tercera prueba (FIB-4, luego ELF y luego FS) redujo la tasa de resultados indeterminados al 8%. Los errores de clasificación se produjeron en porcentajes similares a los de la biopsia (15-21%). La mayoría de las clasificaciones erróneas (63-81%) fueron falsos negativos; entre los casos de falsos positivos (19-27% de las clasificaciones erróneas) hasta el 70% tenían fibrosis F2.

[0143] Conclusión: En estos grandes ensayos globales de fase 3 con umbrales recién derivados y optimizados para los ensayos STELLAR, FIB-4 seguido de ELF y/o FS casi eliminó la necesidad de una biopsia hepática e identificó con precisión a los pacientes con fibrosis avanzada debida a la EHNA, con tasas de clasificación errónea similares a las de la biopsia hepática. Está prevista la validación de estos hallazgos en otras cohortes adicionales.

Tabla 13. Rendimiento diagnóstico de las pruebas NIT para discriminar la fibrosis avanzada (F3-F4)

Prueba*	Cohorte	Tamaño de la muestra	Sensibilidad	Especificidad	Indeterminado	Mal clasificado**
FIB-4 (1.23, 2.1)	Entren.+Test	2496	85%	85%	32%	15%
	Validación	627	83%	89%	32%	15%
ELF (9.35, 10.24)	Entren.+Test	2536	85%	85%	29%	15%
	Validación	637	85%	85%	29%	15%

(continuación)

Prueba*	Cohorte	Tamaño de la muestra	Sensibilidad	Especificidad	Indeterminado	Mal clasificado**
FS (9.6kPa, 14.53kPa)	Entren.+Test	1408	85%	86%	28%	15%
	Validación	357	82%	88%	25%	17%
FIB-4(1.23, 2.1), después ELF(9.35, 10.24)	Entren.+Test	2542	79%	81%	13%	20%
	Validación	638	78%	82%	13%	21%
FIB-4 (1.23, 2.1), después FS (9.6kPa, 14.53kPa)	Entren.+Test	2509	82%	85%	20%	17%
	Validación	632	78%	87%	20%	19%
*El valor más bajo representa el umbral óptimo para excluir la fibrosis avanzada, el valor más alto para diagnosticar la fibrosis avanzada y los valores intermedios se clasifican como indeterminados **Proporción de pacientes mal clasificados con respecto al tamaño total de la muestra, incluida la zona indeterminada						

Ejemplo 6. Identificación de metabolitos séricos asociados a la EHNA y de biomarcadores de diagnóstico mediante una plataforma metabolómica OWLiver® (no conforme a la invención)

[0144] Este ejemplo se llevó a cabo para identificar metabolitos séricos correlacionados con la gravedad de la enfermedad EHNA, y para evaluar el rendimiento de los paneles de metabolitos seleccionados como clasificadores de la fibrosis avanzada, la cirrosis, la EHNA activa y la cirrosis criptogénica. La tecnología aquí utilizada, denominada metabolómica OWLiver®, está disponible comercialmente de la mano de OWL Metabolomics (Bizkaia, España) y se describe en Barr et al, J Proteome Res., 2010, Sep 3;9(9):4501-12, y Mayo et al, Hepatol Commun., 2018, May, 4;2(7):807-820.

[0145] Diseño del estudio: Muestras: En el presente estudio se incluyeron 279 muestras de suero de individuos sanos o de sujetos con EHNA/EHNA con diversos grados de fibrosis hepática confirmada mediante biopsia (F0-F4) (Tabla 14).

Tabla 14. Muestras de suero incluidas en el estudio

Estadio de fibrosis	Sano	F0	F1	F2	F3	F4	Total
N.º de muestras	30	39	45	55	52	58	279

[0146] Plataforma de ensayo: Los perfiles metabolómicos en suero se realizaron utilizando un método basado en la espectrometría de masas (EM) de OWL Metabolomics.

[0147] Análisis de datos: Se realizó un análisis de tendencias para los parámetros categóricos de la EHNA (fibrosis, NAS y componentes) y se llevó a cabo un análisis de correlación para las variables continuas (MQC, ELF, MRE y MRI-PDFF). Para seleccionar los marcadores con un AUROC $\geq$ 0,7 se utilizó la regresión logística univariante (LR) con validación cruzada x5 en 100 veces. Se usó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para seleccionar los marcadores con un valor p ajustado a BH de $<0,05$. Los marcadores superpuestos de los dos análisis se seleccionaron como clasificadores.

[0148] El análisis incluyó metabolitos de las familias que se muestran en la Tabla 15.

Familia		Número
Fosfoetanolamina (PE)	MEMAPE	6
	MAPE	18
	MEPE	2
	DAPE	8
Fosfocolinas (PC)	MAPC	35
	MEPC	12
	DAPC	27
	MEMAPC	18
Fosfoinositol (PI)	DAPI	2
	MAPI	5
	TAG	50
	DAG	6
	FFA	21
	Ácidos biliares	8
	Acilcarnitinas	2
	Ceramidas	3
	Ésteres de colesterol	10
	Esfingolípidos	22
	Aminoácidos	24
	TAG	50

MEMAPE (1-éter, 2-acilglicerofosfoetanolamina), **MAPE** (monoacilglicerofosfoetanolamina), **MEPE** (1-monoéterglicerofosfoetanolamina), **DAPE** (diacilglicerofosfoetanolaminas), **MAPC** (1-monoacilglicerofosfocolina), **MEPC** (1-monoéterglicerofosfocolina), **DAPC** (diacilglicerofosfocolinas), **MEMAPC** (1-éter, 2-acilglicerofosfocolina), **DAPI** (diacilglicerofosfoinositol), **MAPI** (monoacilglicerofosfoinositol), **TAG** (triglicéridos); **DAG** (diacilglicéridos); **FFA** (ácidos grasos libres).

[0149] Los metabolitos asociados significativamente con uno o más de los estadios de la fibrosis se enumeran en las tablas de más abajo.

Tabla 15. Metabolitos asociados significativamente ($p < 0,01$) con el estadio de fibrosis de CRN en sujetos con EHNA (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)		Fosfoetanol amina (PE)	Aminoácidos	Esfingolípidos
<u>PC(0:0/14:0)</u> <u>PC(16:0/0:0)</u> <u>PC(17:0/0:0)</u> <u>PC(18:0/0:0)</u> <u>PC(14:0/20:4)</u> <u>PC(15:0/20:4)</u> <u>PC(16:0/20:5)</u> <u>PC(18:2/20:4)</u> <u>PC(18:3/18:3)</u> PC(0:0/18:2) PC(18:2/0:0) PC(0:0/20:2) PC(0:0/22:4)	<u>PC(O-16:0/0:0)</u> <u>PC(O-18:1/0:0)</u> <u>PC(O-20:0/0:0)</u> <u>PC(O-20:1/0:0)</u> <u>PC(O-20:2/0:0)</u> <u>PC(O-22:0/0:0)</u> <u>PC(O-</u>	<u>PE(0:0/16:0)</u> <u>PE(0:0/18:0)</u> <u>PE(P-16:1/0:0)</u> <u>PE(P-18:2/0:0)</u> <u>LPE(20:5)</u> PE(16:0/18:2) PE(18:1/18:2) PE(22:5/0:0) PE(22:5/0:0) Fosfoinositol (PI) <u>LPI(18:0)</u>	<u>Valina</u> <u>Taurina</u> <u>Leucina</u> <u>Glutamina</u> <u>Lisina</u> <u>Histidina</u> <u>Sarcosina</u> Phe-Phe Ácido glutámico Fenilalanina Ceramidas	<u>SM(d18:1/17:0)</u> <u>SM(d18:1/18:0)</u> <u>SM(d18:1/22:0)</u> <u>SM(d18:1/23:0)</u> <u>SM(d18:2/14:0)</u> <u>SM(d18:2/16:0)</u> <u>SM(d18:2/20:0)</u> <u>SM(31:1)</u> <u>SM(36:2)</u> <u>SM(38:1)</u> <u>SM(39:1)</u> <u>SM(42:1)</u> <u>SM(42:3)</u>
PC(22:4/0:0) PC(0:0/22:5) PC(0:0/22:5) PC(22:5/0:0) PC(22:5/0:0) PC(40:5)	<u>22:1/0:0)</u> <u>PC(O-24:2/0:0)</u> <u>PC(P-16:0/0:0)</u> <u>PC(P-18:0/0:0)</u> <u>PC(P-18:1/0:0)</u> <u>PC(P-20:2/0:0)</u> PC(O-16:0/22:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:0/20:4) PC(O-34:0) PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:0) PC(18:0/18:2)	LPI(18:2) LPI(20:3) LPI(20:4) LPI(22:6) PI(18:0/18:2) Ésteres de colesterol	<u>Cer(d18:1/22:0)</u> <u>Cer(d18:1/24:0)</u> Cer(d18:1/16:0) Ácidos grasos libres <u>20:3n-3</u> <u>20:3n-9</u> <u>20:4n-6</u> <u>20:5n-3</u> <u>22:6n-3</u>	Ácidos biliares Ácido quenodesoxicólico Ácido glicocólico Ácido taurocólico Ácido taurodesoxicólico Ácido tauroquenodesoxicólico
Acilcarnitina	Triacilglicéridos	<u>ChoE(20:3)</u> <u>ChoE(20:4)</u> <u>ChoE(20:5)</u> <u>ChoE(22:6)</u>		
AC(12:0)	<u>TG(44:2)</u> TG(53:0)			

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 16. Metabolitos asociados significativamente ($p < 0,001$) con la puntuación NAS (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)		Fosfoetanolamina (PE)
<u>PC(16:0/16:0)</u>	<u>PC(O-16:0/14:0)</u>	PE(0:0/16:1)
<u>PC(16:0/18:0)</u>	<u>PC(O-16:0/16:0)</u>	Esfingolípidos
<u>PC(20:0/18:2)</u>	<u>PC(O-34:1)</u>	SM(d18:0/18:0)
<u>PC(40:8)</u>	<u>PC(P-16:0/20:4)</u>	Aminoácidos
<u>PC(0:0/20:0)</u>	<u>PC(O-16:0/22:4)</u>	Valina
<u>PC(20:0/0:0)</u>	<u>PC(O-18:0/20:4)</u>	Metionina
<u>PC(0:0/20:1)</u>	<u>PC(O-20:0/20:4)</u>	Ceramidas
<u>PC(20:1/0:0)</u>	<u>PC(O-22:1/20:4)</u>	Cer(d18:1/16:0)
<u>PC(19:0/0:0)</u>	<u>PC(O-22:0/20:4)</u>	
	<u>PC(O-24:1/20:4)</u>	

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 17. Metabolitos asociados significativamente ($p < 0,001$) con la esteatosis (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)		Fosfoetanolamina (PE)	Aminoácidos
<u>PC(16:0/16:0)</u>	<u>PC(O-16:0/14:0)</u>	PE(0:0/16:1)	Valina
<u>PC(16:0/18:0)</u>	<u>PC(O-16:0/16:0)</u>	Fosfoinositol	Taurina
<u>PC(18:0/18:2)</u>	<u>PC(P-16:0/18:2)</u>	<u>PI(18:0/20:4)</u>	Leucina
<u>PC(20:0/18:2)</u>	<u>PC(P-16:0/20:4)</u>	Esfingolípidos	Metionina
<u>PC(19:0/0:0)</u>	<u>PC(O-16:0/22:4)</u>	<u>SM(d18:1/16:0)</u>	Tirosina
<u>PC(0:0/20:0)</u>	<u>PC(P-17:0/20:4)</u>	Ésteres de colesterol	L-Citrulina
<u>PC(20:0/0:0)</u>	<u>PC(O-18:0/20:4)</u>	<u>ChoE(18:3)</u>	Ceramidas
<u>PC(0:0/20:1)</u>	<u>PC(P-18:0/20:4)</u>	Ácidos biliares	Cer(d18:1/16:0)
<u>PC(20:1/0:0)</u>	<u>PC(O-20:0/20:4)</u>	Ácido glicocólico	
<u>PC(O-34:0)</u>	<u>PC(O-22:1/20:4)</u>	Ácido taurocólico	
<u>PC(O-34:1)</u>	<u>PC(O-22:0/20:4)</u>	Ácido tauroquenodesoxicólico	DG(32:2)
<u>PC(40:8)</u>	<u>PC(O-24:1/20:4)</u>		
	PC(14:0/20:4)		
	PC(0:0/14:0)		

>Subrayado y en negrita: correlación negativa, en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 18. Metabolitos asociados significativamente ($p < 0,001$) con el abombamiento de los hepatocitos (no conforme a la invención)

5	Fosfocolinas (PC)	
	PC(O-22:1/20:4)	PC(20:0/18:2)
10	PC(O-24:1/20:4)	PC(O-16:0/14:0)
	PC(19:0/0:0)	PC(40:8)
15	PC(O-34:1)	PC(0:0/20:0)
	PC(O-22:0/20:4)	PC(O-16:0/20:4)
	PC(O-20:0/20:4)	PC(O-18:0/20:4)
20	PC(O-16:0/16:0)	PC(16:0/18:0)
25	PC(P-16:0/20:4)	

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 19. Metabolitos asociados significativamente ($p < 0,01$) con la inflamación lobular (no conforme a la invención)

35	Esfingolípidos
40	SM(38:0) SM(d18:0/18:0) SM(d18:0/22:0)

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 20. Metabolitos asociados significativamente ($p<0,001$) con la cuantificación morfométrica del colágeno (MQC) (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)	Ácidos Biliares
PC(16:0/16:0) PC(18:0/18:1) PC(O-16:0/14:0) PC(O-16:0/16:0) PC(O-16:0/22:4) PC(O-18:0/20:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:0/20:4) PC(O-22:1/20:4) PC(O-24:1/20:4) PC(O-34:0) PC(O-34:1)	<u>PE(22:5/0:0)</u> <u>PE(22:6/0:0)</u> PE(18:1/18:2)	Ácido taurocólico Ácido tauroquenodesoxicólico Ácido glicocólico
	Aminoácidos	Ácidos grasos libres
	<u>Taurina</u> <u>Lisina</u> Metionina Fenilalanina Tirosina Phe-Phe	<u>20:3n-3</u> <u>20:4n-6</u>
		Esfingolípidos
		<u>SM(36:2)</u> <u>SM(d18:1/18:0)</u>

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 21. Metabolitos asociados significativamente ($p<0,001$) con la fibrosis hepática aumentada (ELF) (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)
<u>PC(14:0/20:4)</u> PC(0:0/20:1) PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:0) PC(18:0/18:1) PC(18:0/18:2) PC(18:2/0:0) PC(20:0/18:2) PC(20:1/0:0) PC(O-16:0/14:0) PC(O-16:0/16:0)	PC(O-16:0/18:2) PC(O-16:0/20:4) PC(O-16:0/22:4) PC(O-18:0/20:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:0/20:4) PC(O-22:1/20:4) PC(O-24:1/20:4) PC(O-34:0) PC(O-34:1) PC(O-38:4)
	<u>PE(0:0/22:6)</u> <u>PE(22:6/0:0)</u>
	Aminoácidos
	Metionina Fenilalanina Tirosina
	Ácidos biliares
	Ácido taurocólico Ácido taurodesoxicólico Ácido tauroquenodesoxicólico
Ceramidas	
Cer(d18:1/16:0)	Ácido glicocólico Ácido glicodesoxicólico

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva

Tabla 22. Metabolitos asociados significativamente ($p<0,05$) con la elastografía por resonancia magnética (ERM) (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)	Triacilglicéridos	Diacilglicéridos
<u>PC(0:0/14:0)</u> <u>PC(14:0/20:4)</u> PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:0) PC(20:0/20:4) PC(0:0/20:0) PC(20:0/0:0) PC(0:0/20:1) PC(O-16:0/16:0)	PC(O-34:1) PC(O-16:0/18:2) PC(P-16:0/18:2) PC(P-16:0/20:4) PC(P-18:0/20:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:1/20:4) Esfingolípidos <u>SM(38:0)</u>	<u>PE(0:0/16:0)</u> <u>PE(0:0/16:1)</u> <u>PE(0:0/20:3)</u> <u>PE(20:3/0:0)</u> <u>PE(20:4/0:0)</u> Ésteres de colesterol ChoE(16:0) ChoE(18:1) ChoE(18:3)	<u>TG(44:0)</u> <u>TG(44:1)</u> <u>TG(46:0)</u> <u>TG(46:1)</u> <u>TG(48:0)</u> <u>TG(48:1)</u> <u>TG(48:2)</u> <u>TG(49:0)</u> <u>TG(49:1)</u> <u>TG(50:0)</u> <u>TG(50:1)</u> <u>TG(50:2)</u> <u>TG(52:0)</u> <u>TG(52:1)</u> <u>TG(54:0)</u> <u>TG(54:1)</u> <u>TG(56:1)</u> <u>TG(56:2)</u> <u>DG(32:1)</u> <u>DG(32:2)</u> <u>DG(34:1)</u> <u>DG(34:2)</u> Aminoácidos Ácido glutámico Valina Ácido aspártico L-Citrulina

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 23. Metabolitos significativamente ($p<0,05$) asociados con la resonancia magnética/fracción grasa de densidad de protones (MRI-PDFF) (no conforme a la invención)

Triacilglicéridos	Fosfocolinas (PC)	Aminoácidos
TG(44:0) TG(46:0) TG(47:1) TG(48:0) TG(48:1) TG(49:0) TG(49:1) TG(50:0) TG(50:1) TG(51:1) TG(52:0) TG(52:1) TG(56:1)	<u>PC(18:0/0:0)</u> <u>PC(18:1/0:0)</u> <u>PC(0:0/20:1)</u> <u>PC(20:1/0:0)</u> <u>PC(22:6/0:0)</u> <u>PC(17:0/0:0)</u> <u>PC(0:0/17:1)</u> PC(18:3/0:0)	<u>Glicina</u> <u>Serina</u> <u>Asparagina</u> <u>Ácido aspártico</u> <u>Glutamina</u> Valina Acilcarnitinas <u>AC(8:0)</u> Esfingolípidos <u>SM(d18:0/16:0)</u>

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

Tabla 24. Metabolitos significativamente ($p<0,01$) diferentes en el suero de los sujetos con cirrosis criptogénica en comparación con los sujetos con cirrosis con EHNA (no conforme a la invención)

5	Fosfocolinas (PC)		Fosfoetanolamina (PE)	Triacilglicéridos		Diacilglicéridos
10	<u>PC(0:0/14:0)</u> <u>PC(14:0/20:4)</u> PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:0) PC(20:0/20:4) PC(0:0/20:0) PC(20:0/0:0) PC(0:0/20:1) PC(O-16:0/16:0)	PC(O-34:1) PC(O-16:0/18:2) PC(P-16:0/18:2) PC(P-16:0/20:4) PC(P-18:0/20:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:1/20:4)	<u>PE(0:0/16:0)</u> <u>PE(0:0/16:1)</u> <u>PE(0:0/20:3)</u> <u>PE(20:3/0:0)</u> <u>PE(20:4/0:0)</u>	<u>TG(44:0)</u> <u>TG(44:1)</u> <u>TG(46:0)</u> <u>TG(46:1)</u> <u>TG(48:0)</u> <u>TG(48:1)</u> <u>TG(48:2)</u> <u>TG(49:0)</u> <u>TG(49:1)</u>	<u>TG(50:0)</u> <u>TG(50:1)</u> <u>TG(50:2)</u> <u>TG(52:0)</u> <u>TG(52:1)</u> <u>TG(54:0)</u> <u>TG(54:1)</u> <u>TG(56:1)</u> <u>TG(56:2)</u>	<u>DG(32:1)</u> <u>DG(32:2)</u> <u>DG(34:1)</u> <u>DG(34:2)</u>
15			Ésteres de colesterol			Aminoácidos
20			ChoE(16:0) ChoE(18:1) ChoE(18:3)			Ácido glutámico Valina Ácido aspártico L-Citrulina
25		Esfingolípidos				
		<u>SM(38:0)</u>				

>Subrayado y en negrita: correlación negativa; en caso contrario, correlación positiva.

30 **[0150]** La Figura 19 muestra que los marcadores de metabolitos comunes están presentes entre los distintos fenotipos de la EHNA. Fibrosis avanzada ($F \geq 3$) sola: 17 metabolitos; cirrosis ($F=4$) sola: 30 metabolitos; cirrosis criptogénica ($F=4$; sin esteatosis) sola: 34 metabolitos; EHNA activa, puntuación $NAS \geq 5$ sola: 29 metabolitos.

Tabla 25. Clasificadores para el diagnóstico de cirrosis y/o fibrosis avanzada (no conforme a la invención)

35	Fibrosis avanzada ($F3/4$ vs $F0-2$); AUROC ≥ 0.70 ; $p < 0.05$	
40	Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)
45	PC(0:0/22:5) <u>PC(O-16:0/0:0)</u> <u>PC(O-18:1/0:0)</u> <u>PC(O-20:0/0:0)</u> <u>PC(O-20:1/0:0)</u> <u>PC(O-20:2/0:0)</u> <u>PC(O-22:0/0:0)</u> <u>PC(O-22:1/0:0)</u> <u>PC(P-16:0/0:0)</u>	<u>PE(P-16:1/0:0)</u> Ácidos biliares GCA TCA TCDCA Fosfoinositol (PI) LPI(18:2)
50		
55		
60	<u>PC(P-18:0/0:0)</u> <u>PC(P-18:1/0:0)</u>	Aminoácidos <u>Taurina</u>

65 >Subrayado y en negrita: más bajo en $F3/4$; de lo contrario, más alto en $F3/4$.

Cirrosis (F4 vs F0-3); AUROC>=0.70; p<0.05		
Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)	Aminoácidos
<u>PC(14:0/20:4)</u> <u>PC(O-16:0/0:0)</u> <u>PC(P-16:0/0:0)</u> PC(16:0/16:0) PC(16:0/18:0) PC(O-16:0/16:0) PC(O-16:0/22:4) PC(O-18:0/20:4) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:0/20:4) PC(O-22:1/20:4) PC(O-34:0) PC(O-34:1)	<u>PE(P-16:1/0:0)</u> PE(18:1/18:2)	<u>Lisina</u> <u>Taurina</u> Fenilalanina Phe-Phe Tirosina
	Ácidos biliares	
	GCA. Ácido glicocólico TCA. Ácido taurocólico Ácido tauroquenodesoxicólico	
		Ceramidas
		Cer (d18:1/16:0)
		Ácidos grasos libres
	<u>SM(36:2)</u> <u>SM(38:1)</u> <u>SM(d18:1/18:0)</u> <u>SM(d18:1/22:0)</u>	<u>20:3n-3</u> <u>20:4n-6</u>

>Subrayado y en negrita: más bajo en F3/4; de lo contrario, más alto en F3/4.

Tabla 26. Clasificadores para cirrosis criptogénica (cirrosis criptogénica (CC) versus EHNA con cirrosis (NC); AUROC>=70; p<0,05) (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)	Fosfoetanolamina (PE)	Triacilglicéridos
<u>PC(0:0/14:0)</u> <u>PC(14:0/20:4)</u> PC(0:0/20:0) PC(0:0/20:1) PC(16:0/16:0) PC(20:0/0:0) PC(20:0/20:4) PC(O-16:0/16:0) PC(O-16:0/18:2) PC(O-20:0/20:4) PC(O-22:1/20:4) PC(O-34:1) PC(P-16:0/18:2) PC(P-16:0/20:4) PC(P-18:0/20:4)	<u>PE(0:0/20:3)</u> <u>PE(20:3/0:0)</u>	<u>TG(46:0)</u> <u>TG(46:1)</u> <u>TG(48:0)</u> <u>TG(48:1)</u> <u>TG(48:2)</u> <u>TG(50:0)</u> <u>TG(50:1)</u> <u>TG(50:2)</u> <u>TG(52:1)</u>
	Diacilglicéridos	
	<u>DG(32:1)</u> <u>DG(32:2)</u> <u>DG(34:1)</u> <u>DG(34:2)</u>	
	Aminoácidos	Éster de colesterol
	<u>Ácido aspártico</u> <u>Ácido glutámico</u> <u>Valina</u> L-Citrulina	ChoE(16:0) ChoE(18:1) ChoE(18:3)

>Subrayado y en negrita: más bajo en CC; de lo contrario, más alto en CC.

Tabla 27. Clasificadores para EHNA activa (NAS $\geq$ 5; AUROC $\geq$ 0,70; p $\leq$ 0,05) (no conforme a la invención)

Fosfocolinas (PC)		Fosfoetanolamina (PE)
<u>PC(0:0/20:0)</u>	<u>PC(O-18:0/20:4)</u>	<u>PE(18:1/18:2)</u>
<u>PC(0:0/20:1)</u>	<u>PC(O-20:0/20:4)</u>	PE(22:6/0:0)
<u>PC(16:0/16:0)</u>	<u>PC(O-22:0/20:4)</u>	<u>PE(P-16:0/18:2)</u>
<u>PC(16:0/18:0)</u>	<u>PC(O-22:1/20:4)</u>	
<u>PC(19:0/0:0)</u>	<u>PC(O-24:1/20:4)</u>	Esfingolípidos
<u>PC(20:0/0:0)</u>	<u>PC(O-34:0)</u>	SM(d18:0/18:0)
<u>PC(O-16:0/14:0)</u>	<u>PC(O-34:1)</u>	
<u>PC(O-16:0/16:0)</u>	<u>PC(P-16:0/18:2)</u>	Aminoácidos
<u>PC(O-16:0/18:2)</u>	<u>PC(P-16:0/20:4)</u>	
<u>PC(O-16:0/20:4)</u>	<u>PC(P-17:0/20:4)</u>	<u>Metionina</u>
<u>PC(O-16:0/22:4)</u>	<u>PC(P-18:0/20:4)</u>	<u>Tirosina</u>
		Ceramidas
		<u>Cer(d18:1/16:0)</u>

>Subrayado y en negrita: más bajo en NAS $\geq$ 5; de lo contrario, más alto en NAS $\geq$ 5

[0151] A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona con conocimientos comunes en la técnica a la que pertenece la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar a un paciente con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con fibrosis grave, de manera que el método incluye:

5 medir los niveles proteicos de colectina renal 1 (CL-K1), espondina-1 (RSPO1), metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), componente del complemento 7 (C7), proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y trombospondina-2 (TSP2) en una muestra de suero aislada del paciente con EHNA;

10 determinar si el estadio de fibrosis hepática de la Red de Investigación Clínica (CRN) de la Esteatohepatitis No Alcohólica en el paciente con EHNA es un estadio 3 o 4 basándose en los niveles proteicos medidos y en diversos valores de referencia predeterminados, de manera que los valores de referencia predeterminados incluyen los niveles proteicos de referencia para la colectina renal 1 (CL-K1), la espondina-1 (RSPO1), la metalopeptidasa de matriz 7 (MMP-7), el componente del complemento 7 (C7), la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7), la subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (IL-5Ra) y la trombospondina-2 (TSP2) en los estadios de fibrosis de la CRN de 0 a 4; y

15 clasificar al paciente con EHNA con fibrosis grave si el estadio de fibrosis de la CRN determinado es 3 o 4.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

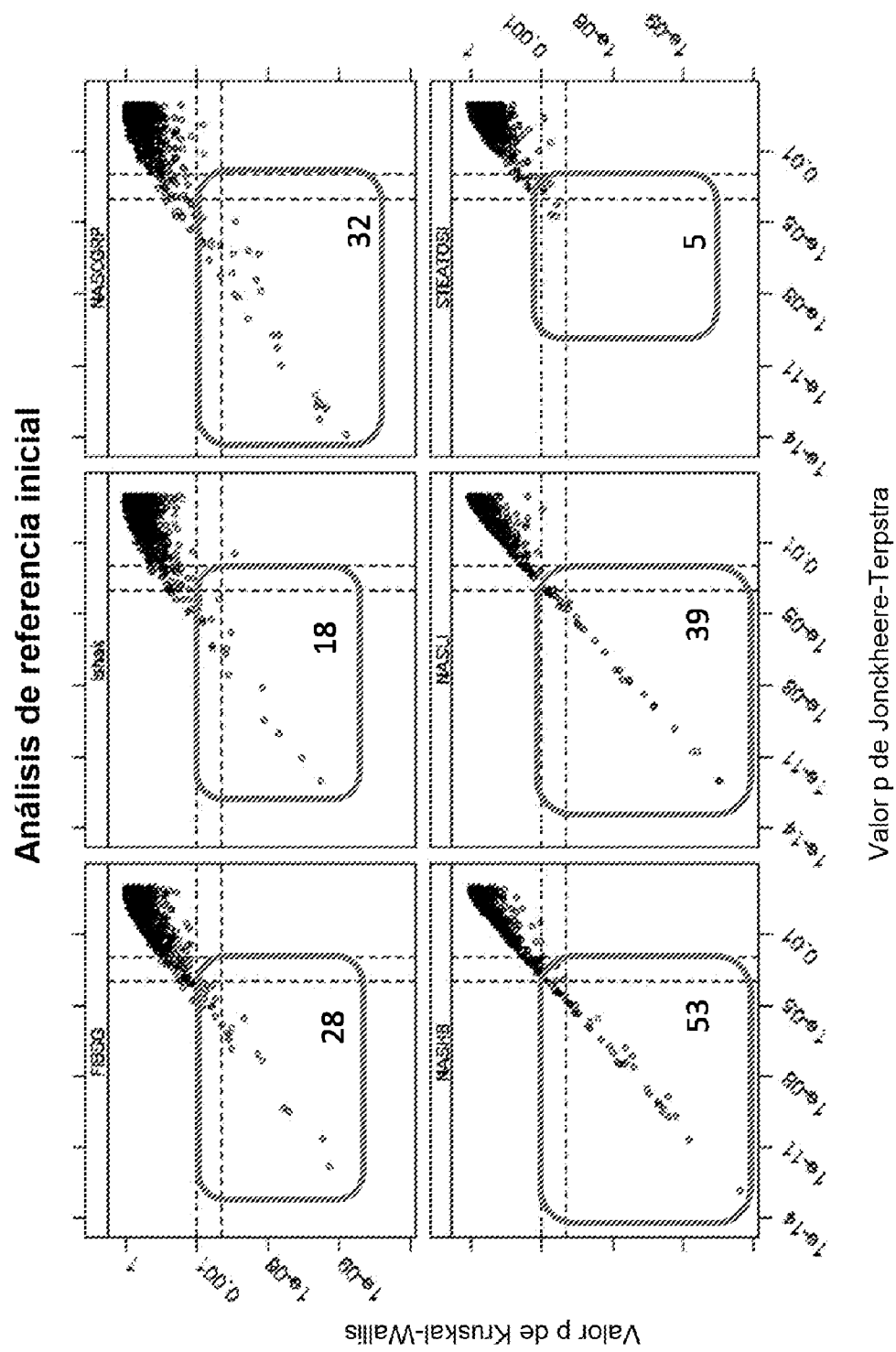


FIG. 1

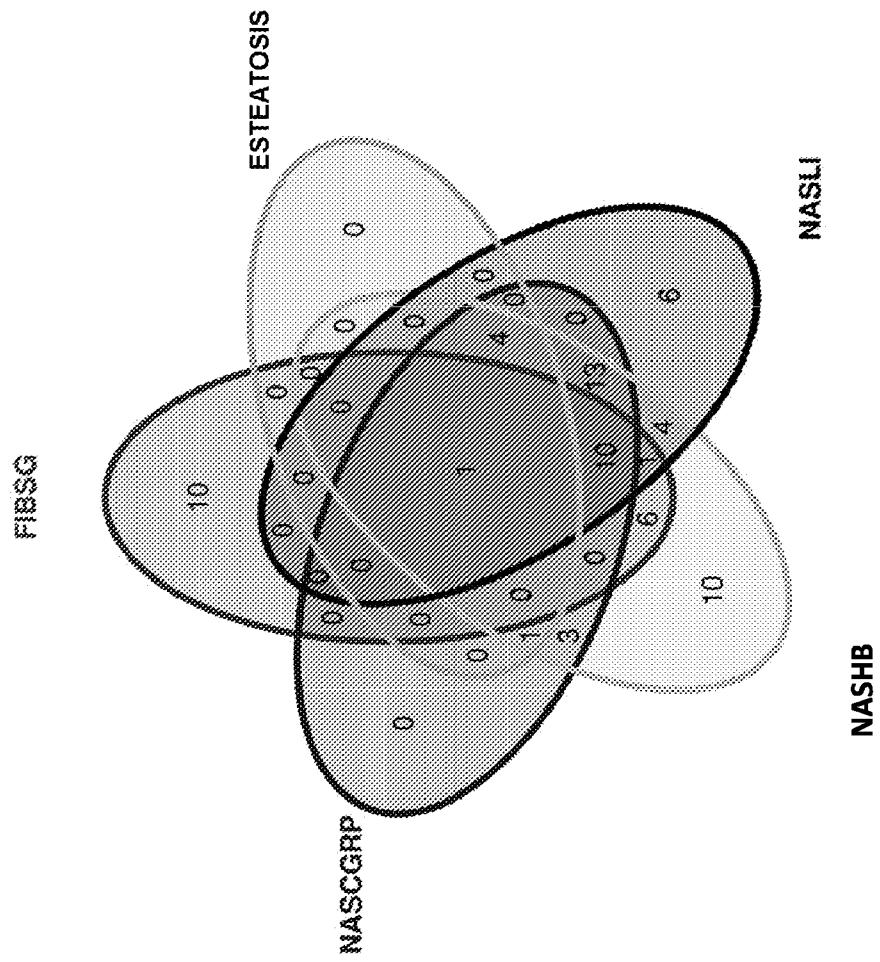


FIG. 2

Marcador	Fibrosis inicial F0-2 vs. F3-4		Fibrosis inicial F0-1 vs. F2-4	
	AUC	90% CI	AUC	90% CI
Mejor marcador: C7	0.77	(0.71, 0.83)	0.81	(0.75, 0.88)
Conjunto común (7 marcadores)	0.83	(0.77, 0.89)	0.86	(0.80, 0.92)

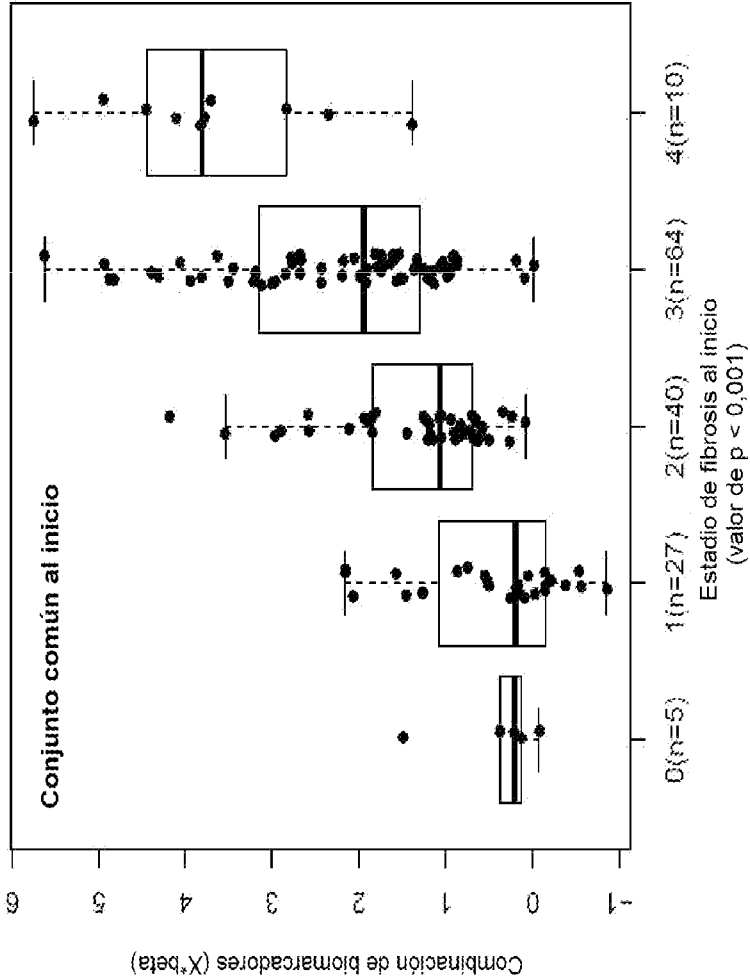


FIG. 3

Marcador	Mejoría de la Fibrosis	
	AUC	90% CI
Mejor marcador: pTEN	0.75	(0.65, 0.85)
Marcadores seleccionados (top 7)	0.90	(0.84, 0.96)
Marcadores seleccionados (top 5)	0.87	(0.80, 0.94)
Marcadores seleccionados (top 3)	0.80	(0.71, 0.90)
MRE	0.79	(0.68, 0.89)
FibroScan	0.72	(0.60, 0.83)
CK18M30	0.70	(0.59, 0.82)
CK18M30 + MRE	0.85	(0.76, 0.93)
CK18M30 + Fibroscan	0.79	(0.68,0.89)
Marcadores seleccionados + CK18M30 + MRE	0.95	(0.91, 0.99)
Marcadores seleccionados + CK18M30 + Fibroscan	0.93	(0.87, 0.98)

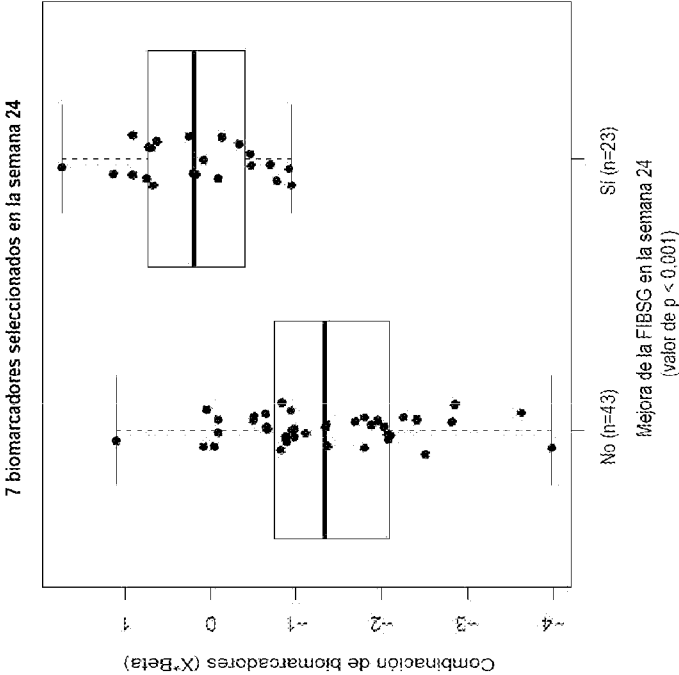


FIG. 4

Marcador	Mejora de la esteatosis	
	AUC	90% CI
Mejor marcador: Integrin_a1b1	0.81	(0.72, 0.91)
Los 5 marcadores más destacados	0.89	(0.83, 0.96)
Marcadores seleccionados (top 12)	0.95	(0.92, 0.99)

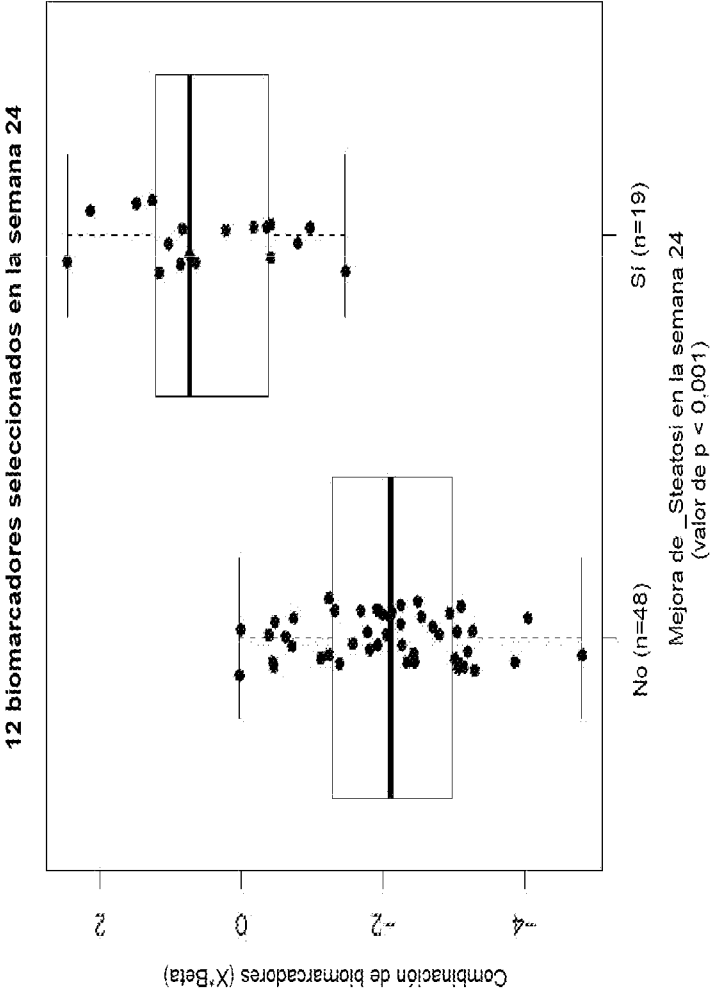


FIG. 5

Marcador	Mejora de la inflamación	
	AUC	90% CI
	0.85	(0.77, 0.94)
Mejor marcador: HSP_90a_b		
Mejor conjunto (5 mejores marcadores)	0.88	(0.80, 0.96)

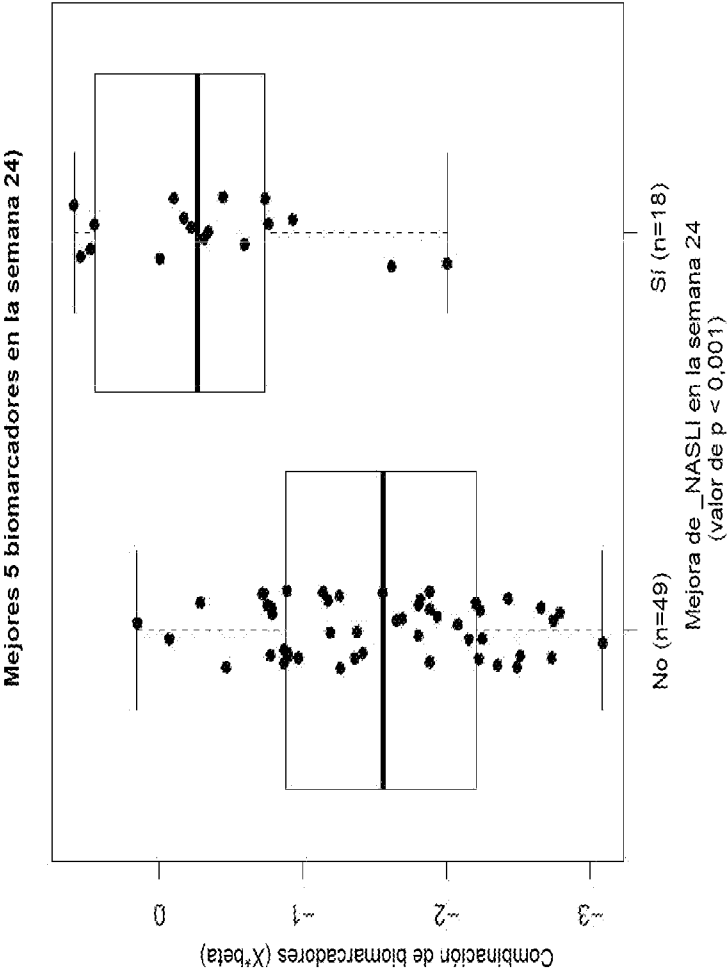


FIG. 6

Mejora del abombamiento	
Marcador	AUC
Mejor Marcador: Fibronectina	0.80
Marcadores seleccionados (top 7)	0.97

7 biomarcadores seleccionados en la semana 24

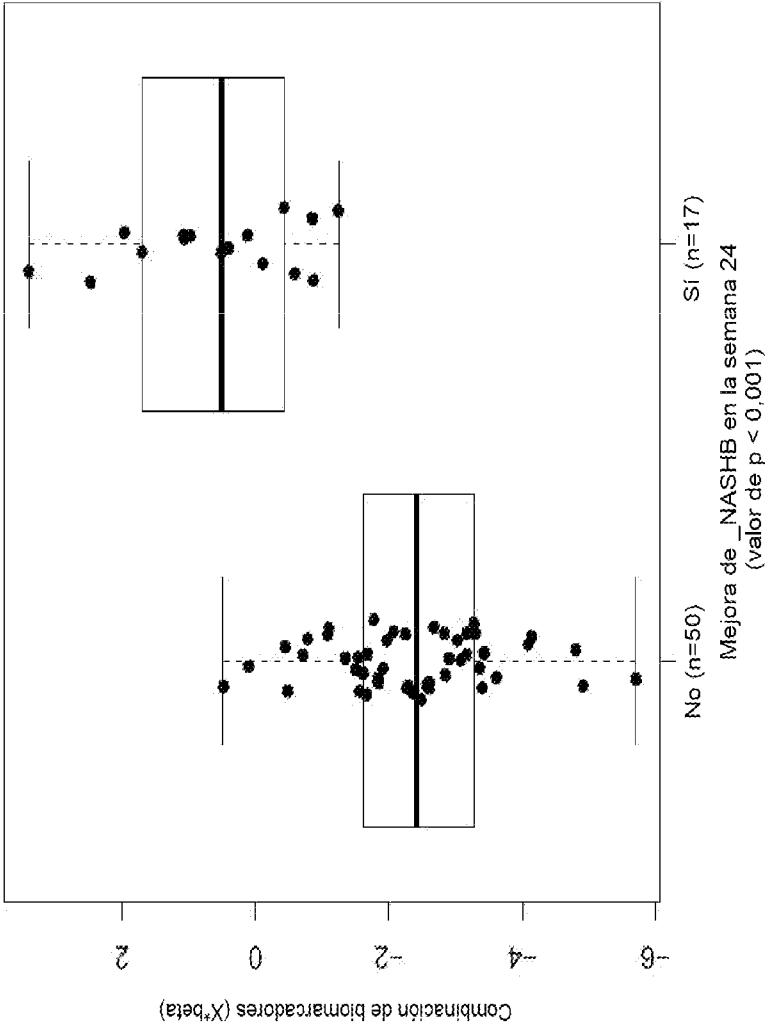


FIG. 7

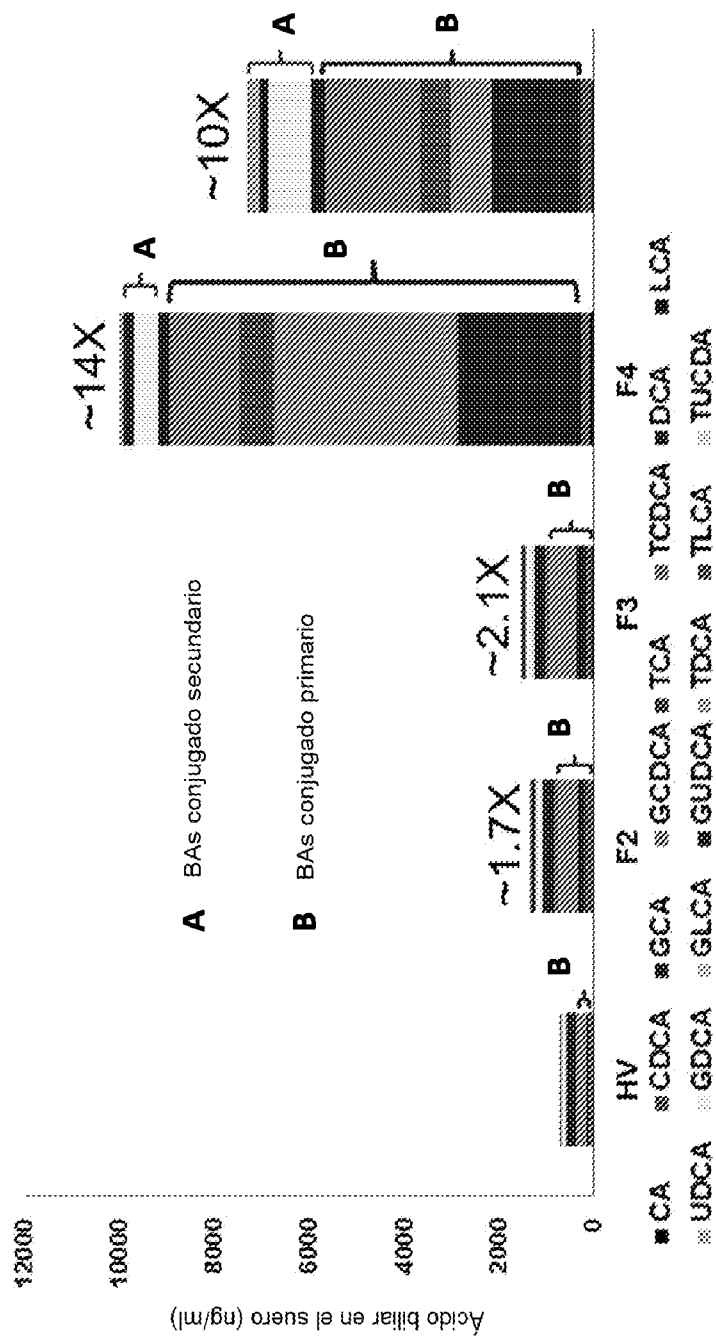


FIG. 8

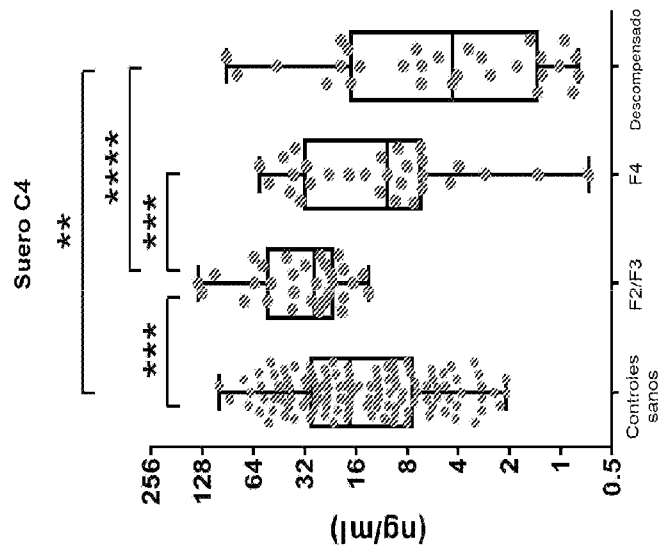


FIG. 9

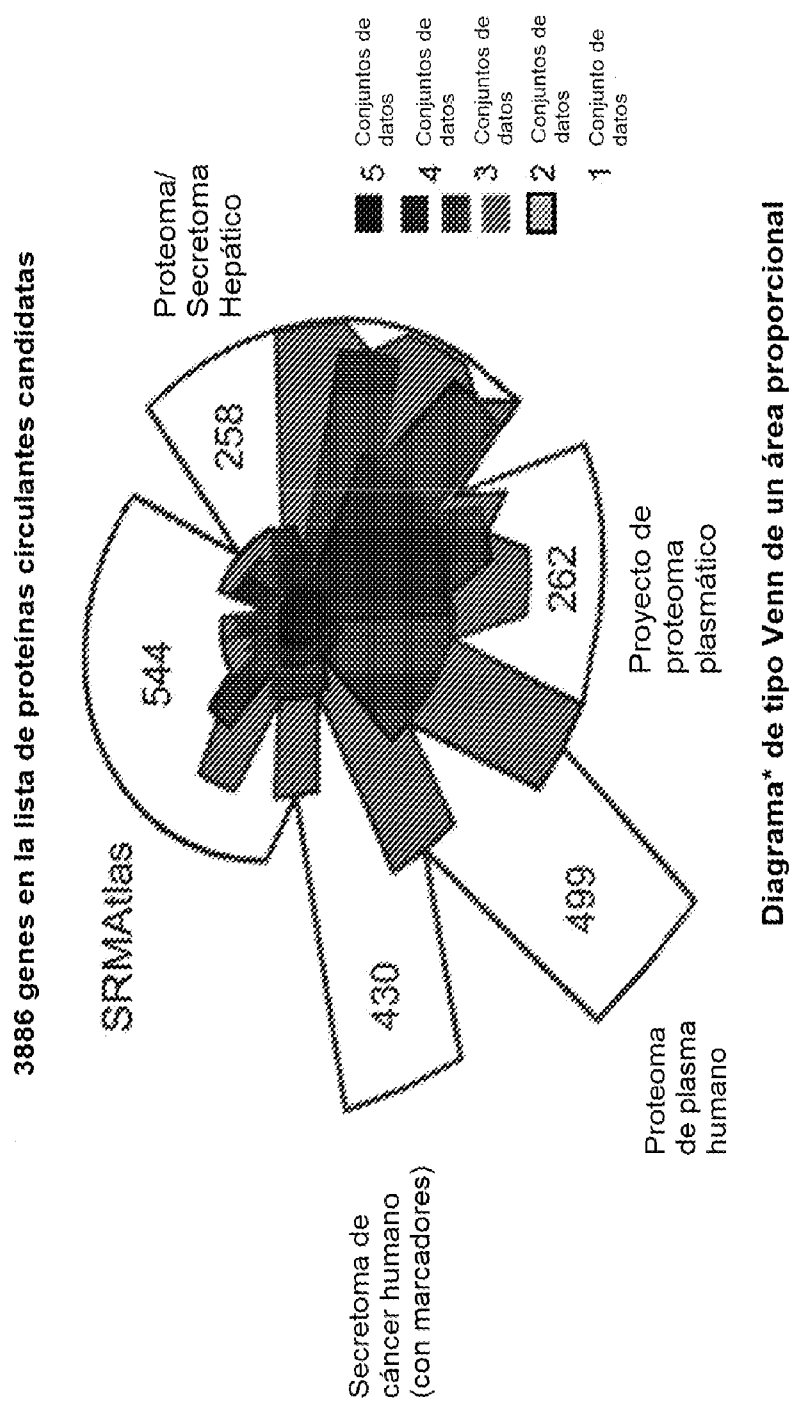


FIG. 10

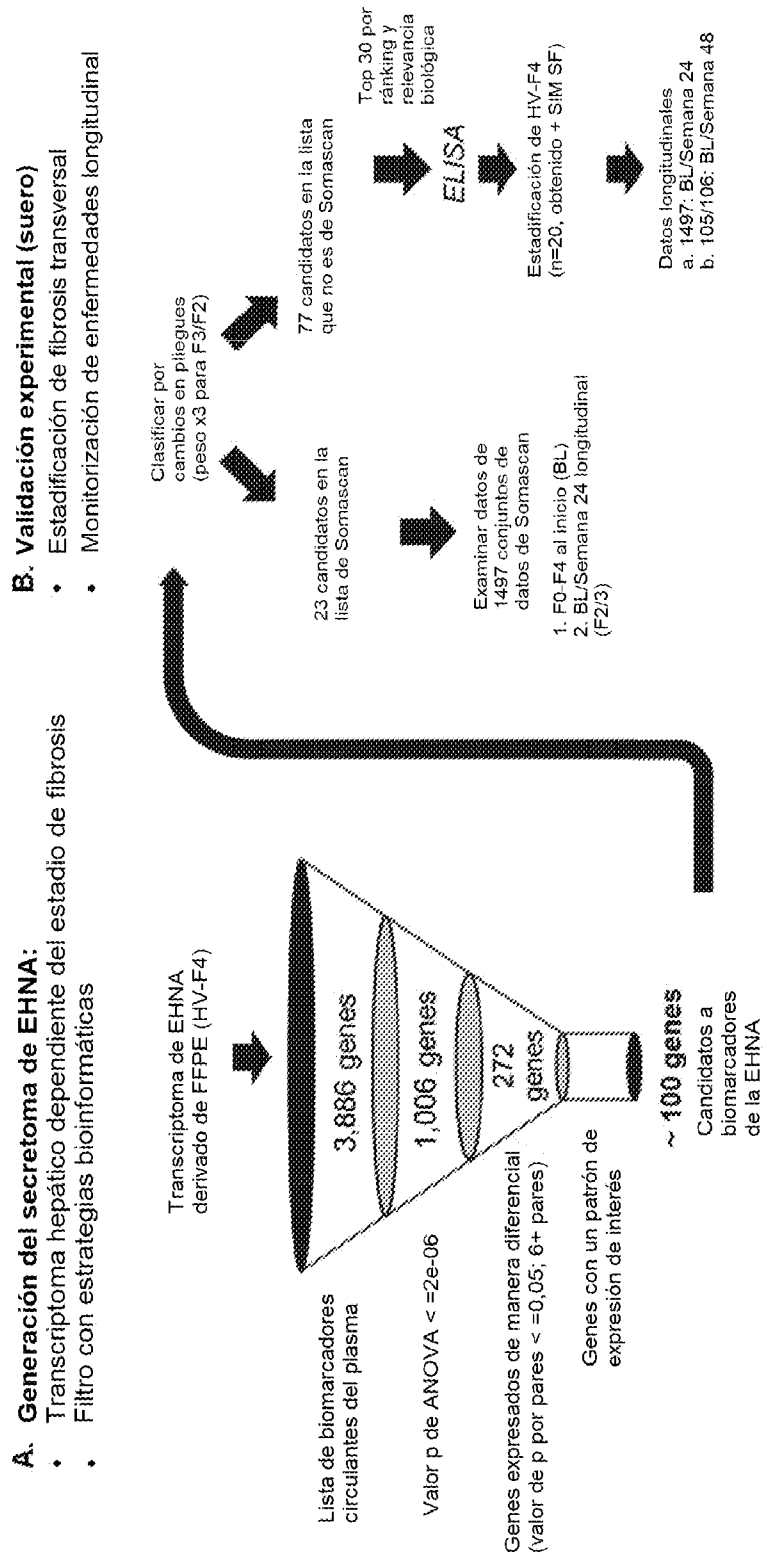


FIG. 11

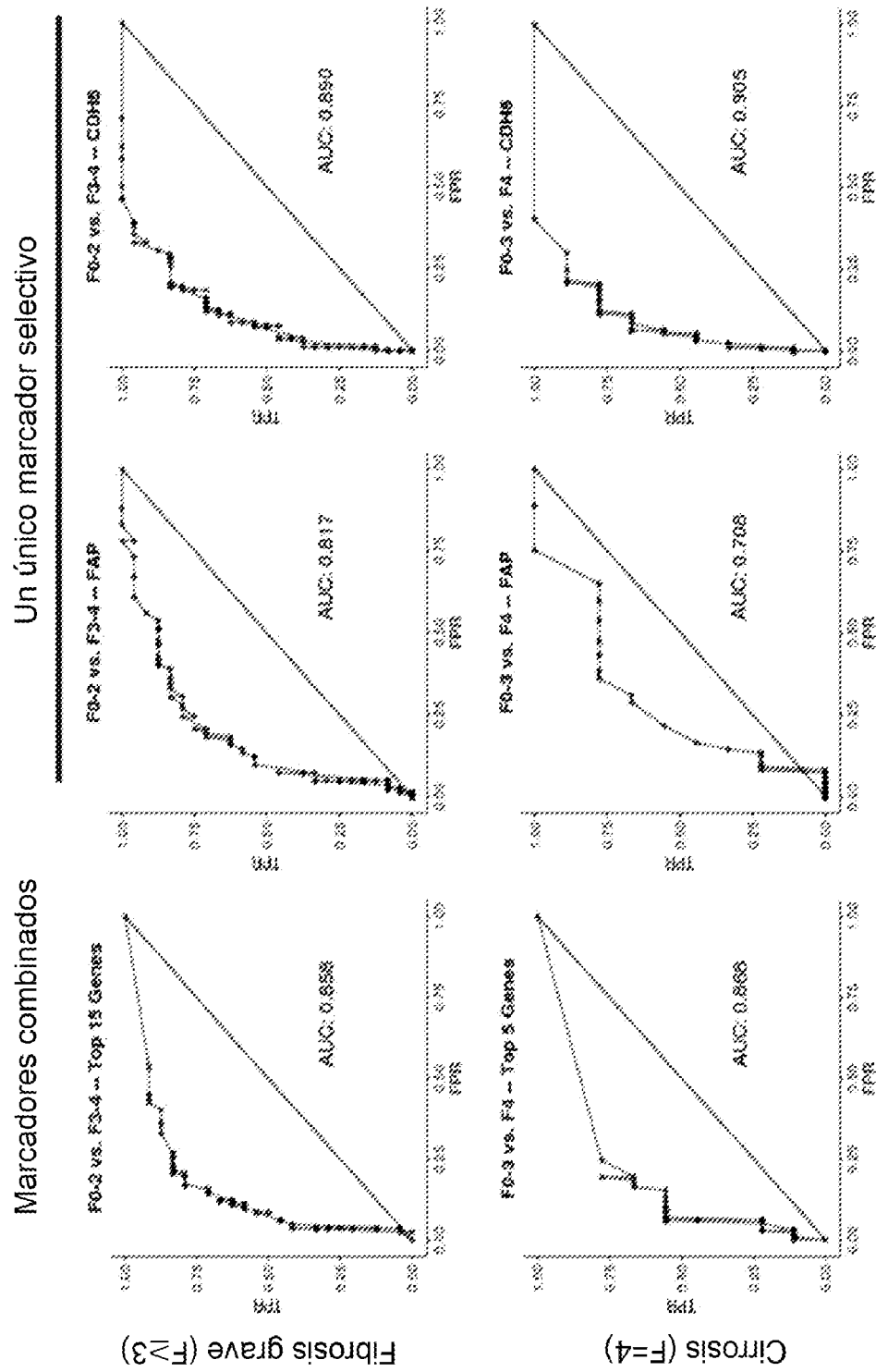


FIG. 12

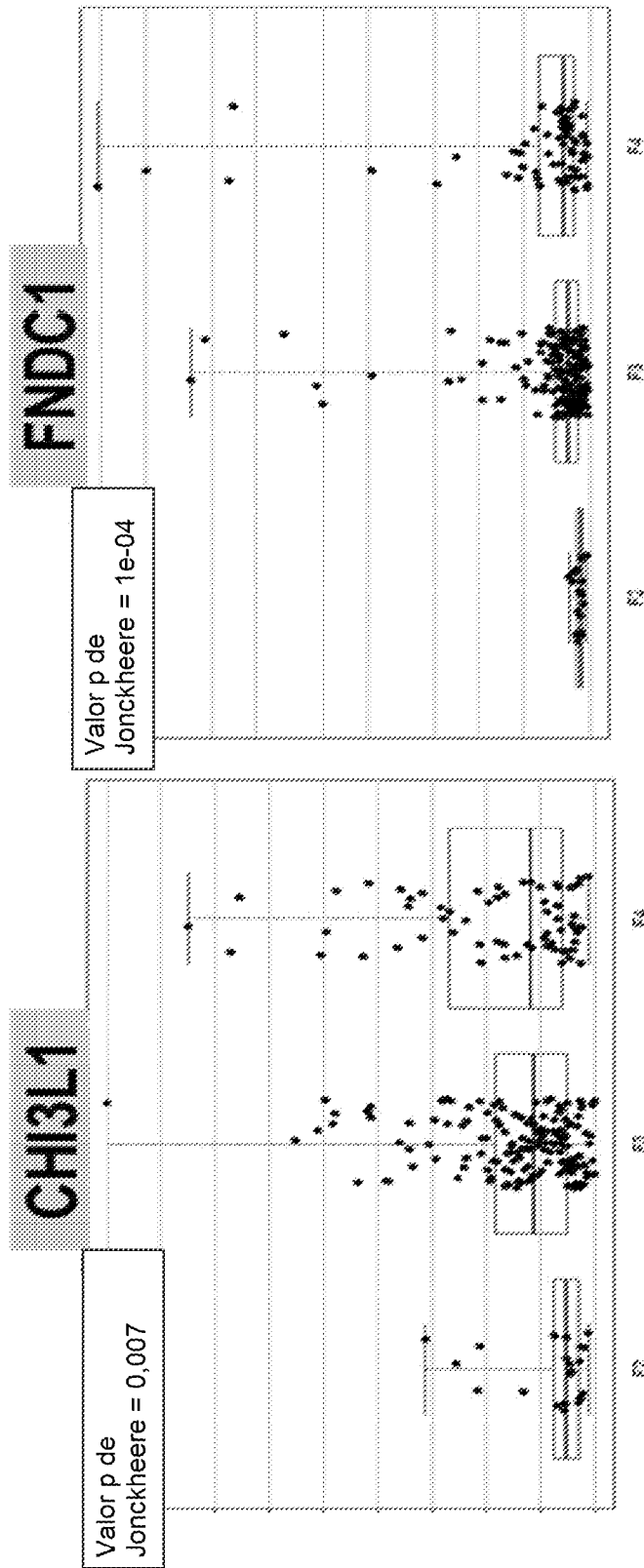


FIG. 13

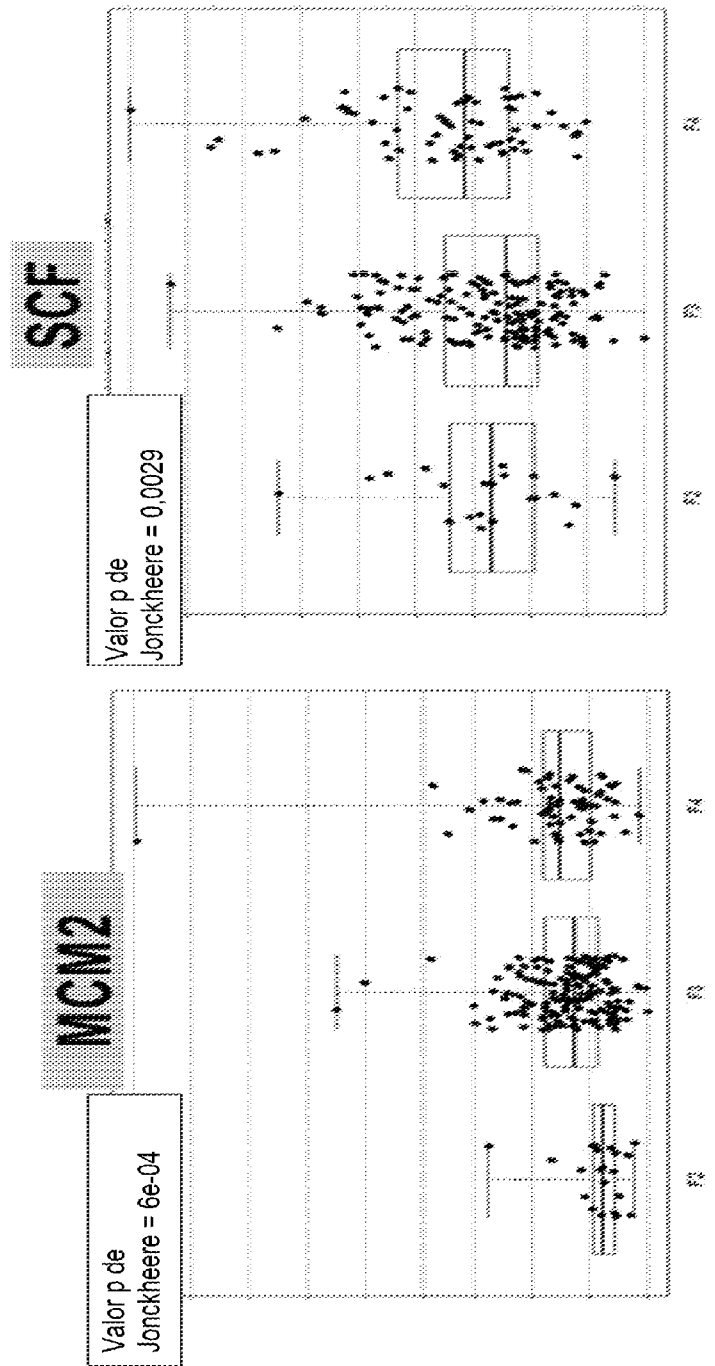


FIG. 13 (continuación)

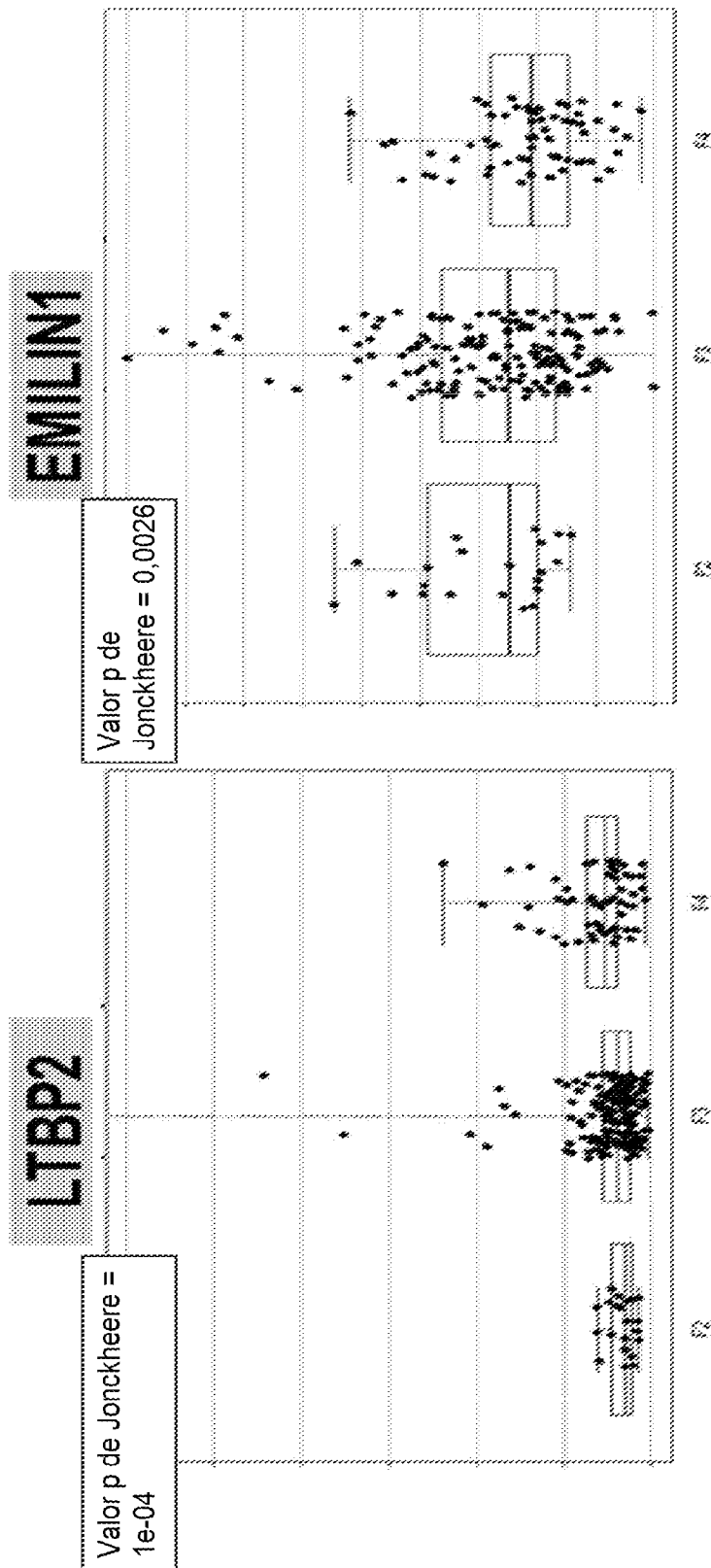


FIG. 13 (continuación)

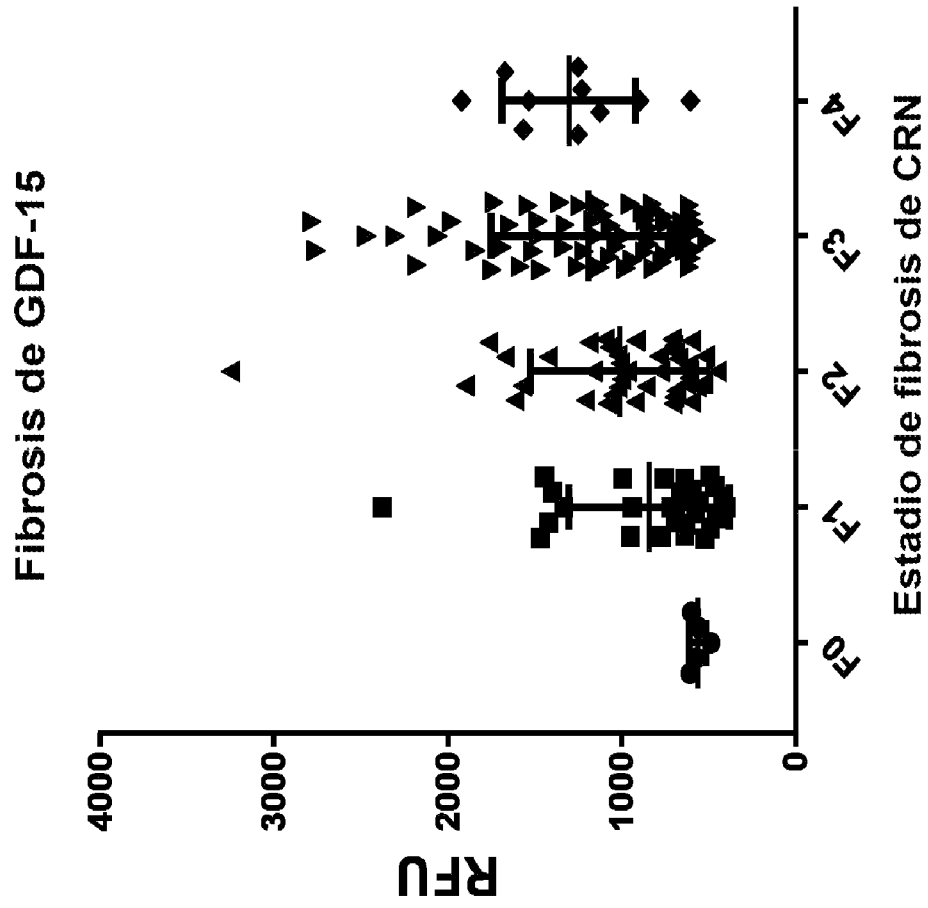


FIG. 14

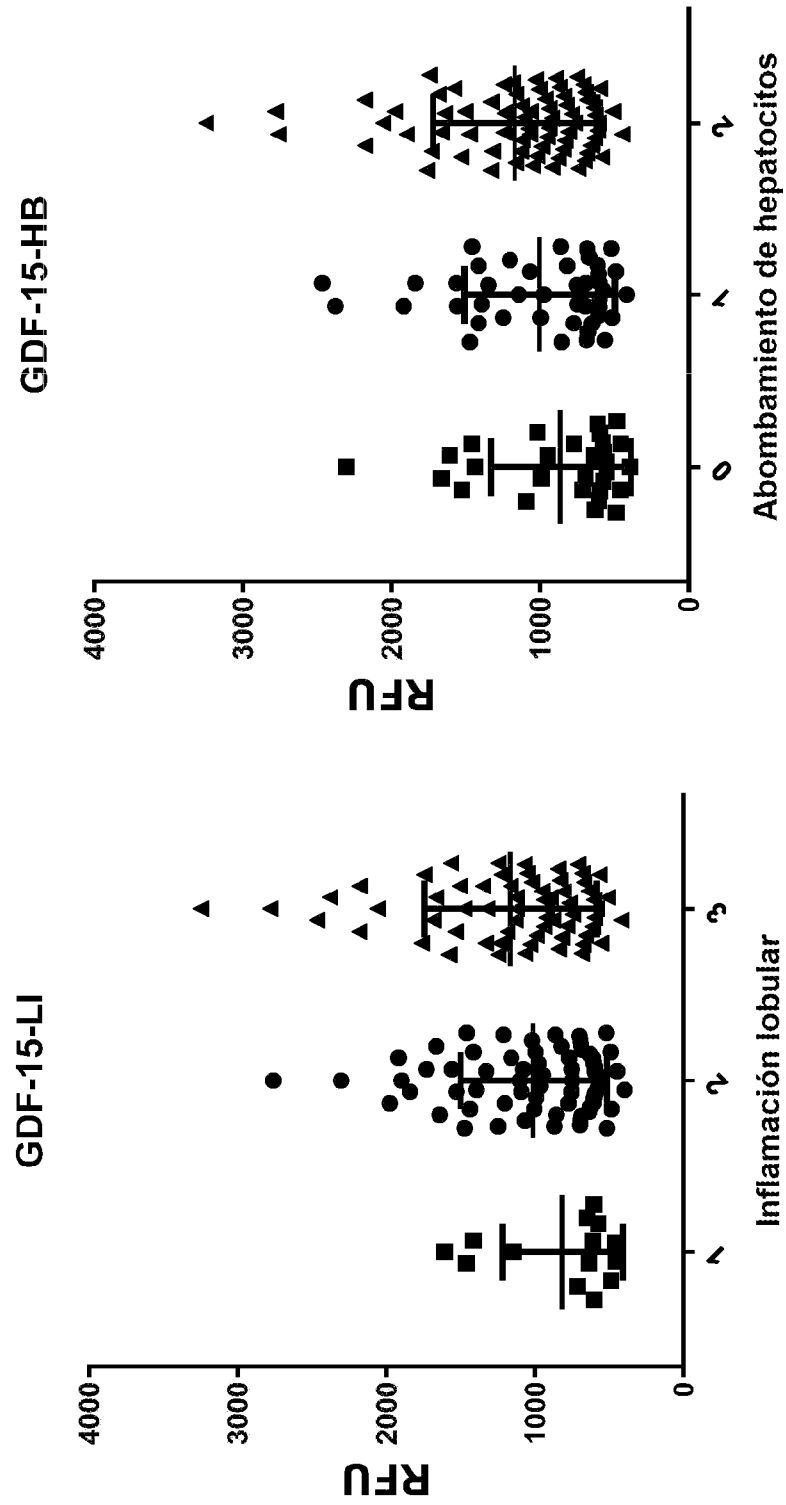


FIG. 15

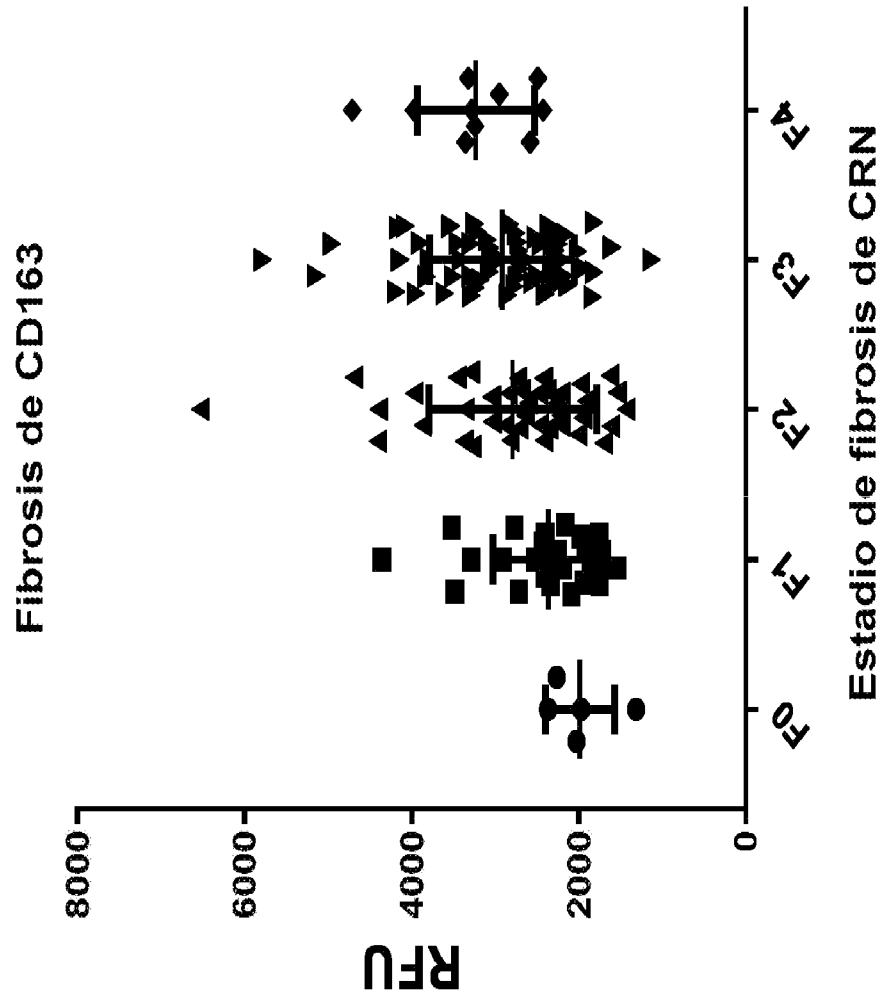


FIG. 16

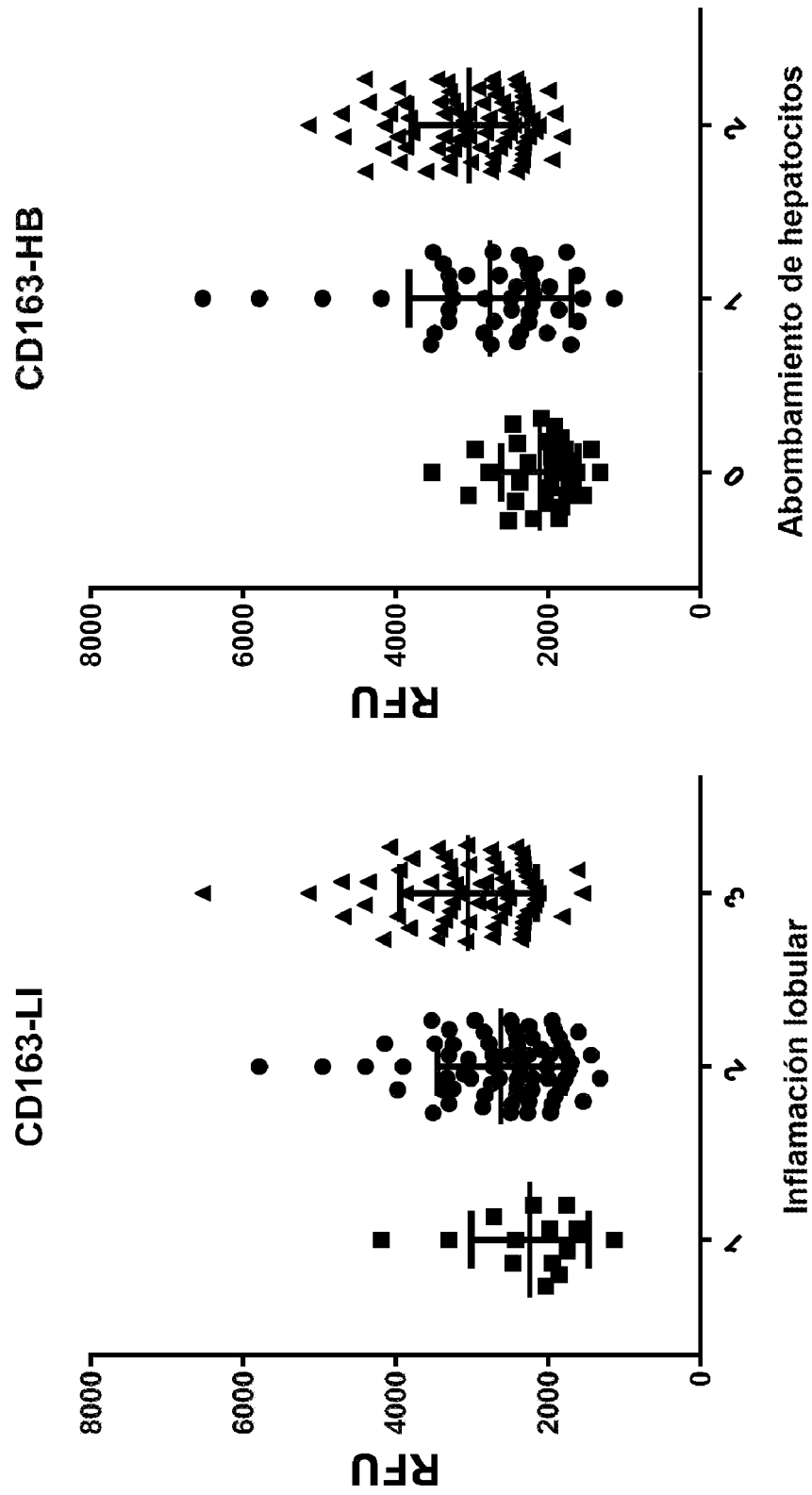


FIG. 17

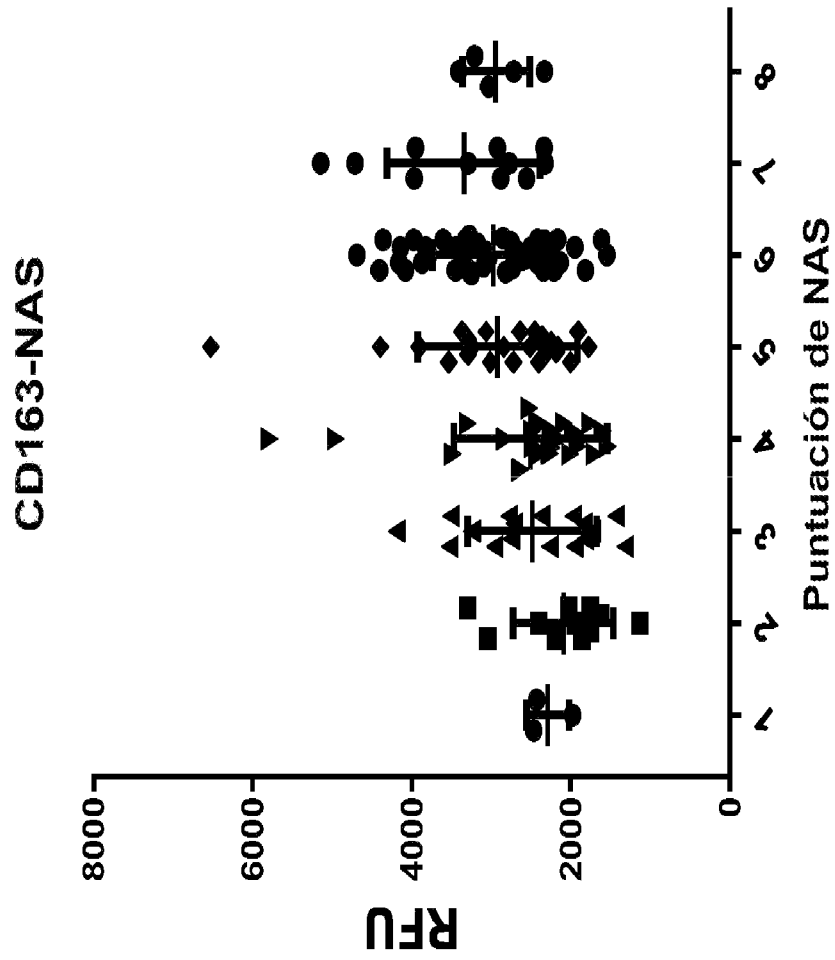
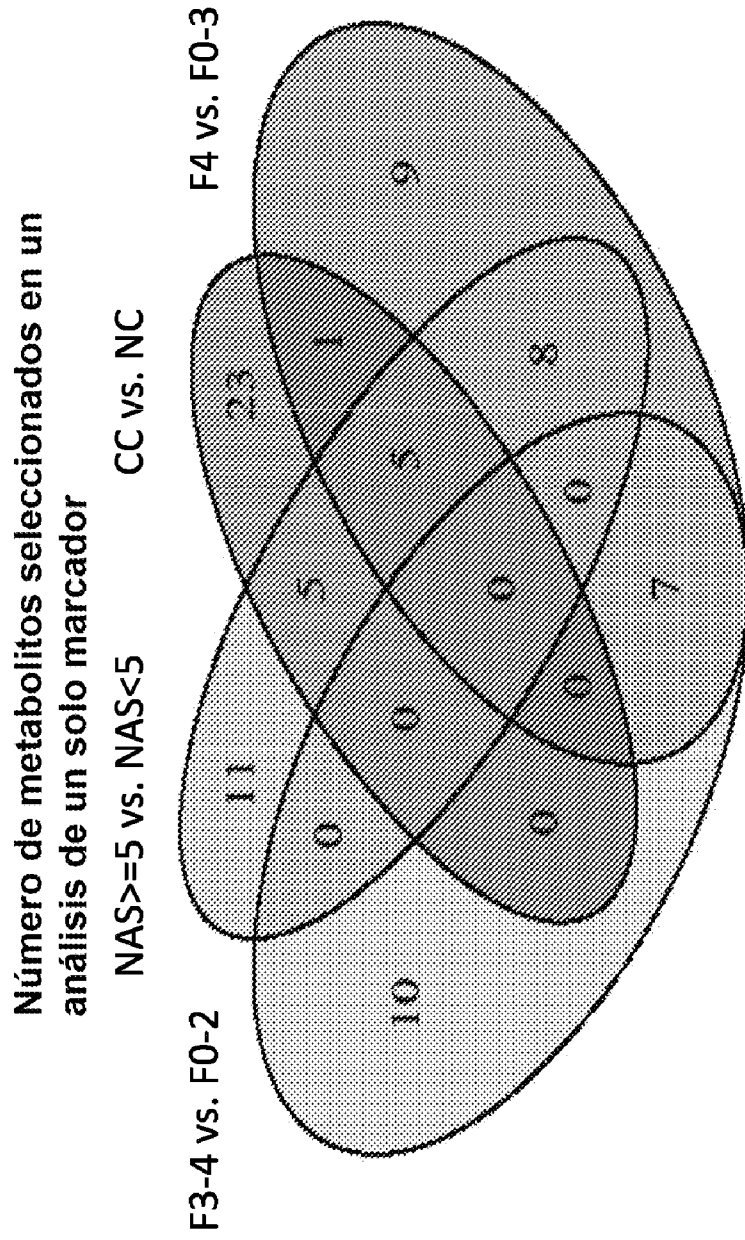


FIG. 18



AUC $\geq$ 0,7 en una regresión logística univariante & valor de p ajustado a BH $<$ 0,05 en la prueba de suma de rangos de Wilcoxon

FIG. 19