



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 962**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **01945050 .1**
86 Fecha de presentación : **26.04.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1283989**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.02.2003**

54 Título: **Diagnóstico de fibrosis hepática con algoritmos de marcadores séricos.**

30 Prioridad: **28.04.2000 EP 00109063**
13.04.2001 IT MI00A0813

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **Bayer Aktiengesellschaft**
51368 Leverkusen, DE
BAYER CORPORATION

72 Inventor/es: **Völker, Michael;**
Becka, Michael;
Kroll, Werner;
Knorr, Andreas;
Unger, Sylvia;
Gehrmann, Mathias;
Hennig, Guido;
Burchardt, Elmar-Reinhold;
Arthur, Michael, J.;
Burt, Alastair, D.;
Pinzani, Massimo y
Schuppan, Detlef

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Diagnóstico de fibrosis hepática con algoritmos de marcadores séricos.

5 Las enfermedades fibróticas progresivas del hígado son una causa principal de morbilidad en todo el mundo. Recientes avances científicos demuestran que el proceso patológico de fibrosis en el hígado depende fundamentalmente de la proliferación y activación de células estrelladas hepáticas (también denominadas lipocitos, células de Ito o de almacenamiento de grasa) que sintetizan y secretan proteínas de matriz extracelular en exceso (1). Además es evidente que este proceso es común a la enfermedad hepática de todas las etiologías. De particular importancia son la hepatitis vírica crónica B y C y la enfermedad hepática alcohólica así como enfermedades hepáticas genéticas y auto-inmunitarias, que conducen todas a problemas clínicos mediante la ruta final común de fibrosis hepática progresiva, con el eventual desarrollo de cirrosis.

15 Un concepto importante es la distinción entre fibrosis hepática y cirrosis. La fibrosis hepática es una acumulación reversible de matriz extracelular en respuesta a una lesión crónica en la que todavía no se han desarrollado nódulos, mientras que la cirrosis implica un proceso irreversible, en el que bandas gruesas de matriz rodean completamente el parénquima, formando nódulos. En consecuencia, cualquier tratamiento debe dirigirse hacia los pacientes con enfermedad reversible (fibrosis), lo que requerirá la identificación y seguimiento tempranos de aquellos en riesgo (2).

20 La gravedad y la progresión de la fibrosis hepática son difíciles de evaluar, siendo aún actualmente la biopsia de hígado el método clínico más fiable. La evaluación cualitativa de la fibrosis hepática mediante biopsias está limitada por la variabilidad interobservador. Las biopsias son claramente inadecuadas para la fase clínica temprana del desarrollo de fármacos, en la que es imprescindible emplear métodos menos invasivos que identifiquen compuestos eficaces en un plazo de tiempo comercialmente aceptable, medido normalmente en semanas hasta un máximo de tres meses de exposición terapéutica experimental. Otras desventajas son la baja especificidad de diagnóstico y el riesgo de hemorragia. Por tanto, existe una necesidad de marcadores sustitutos de fibrosis hepática. Las pruebas séricas permiten una evaluación no invasiva de la fibrogénesis y fibrolisis en el hígado y pueden realizarse repetidamente y a intervalos cortos de tiempo (3). Las pruebas séricas que miden los procesos dinámicos de la síntesis de la matriz extracelular (fibrogénesis) y degradación de la matriz extracelular (fibrolisis) reflejan la cantidad de matriz extracelular presente, el grado de fibrosis o el proceso en curso de cambio arquitectónico del hígado (4).

El estado actual de la técnica para medir marcadores sustitutos de fibrosis hepática está poco desarrollado. Estudios previos han sugerido que puede usarse la concentración sérica de proteínas de matriz extracelular (o sus fragmentos de excisión) para evaluar la gravedad y progresión de la fibrosis hepática (4.5, documentos US 5 316 914, EP 0 283 779). Se han investigado diferentes marcadores séricos y se han encontrado correlaciones con biopsias de hígado y la gravedad de las enfermedades hepáticas (6).

La publicación J. P. TEARE *AL.* se refiere a "Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis" (LANCET THE., vol. 342, n° 8876, 9 de octubre de 1993 (1 993-1 0-09), páginas 895-898),

la publicación X. JI *ET AL.* se refiere a "Clinical significance of serum 7s collagen and type VI collagen levels for the diagnosis of hepatic fibrosis." (CHINESE MEDICAL JOURNAL 1 ZHONGHUA YIXUE ZAZHI YINGWEN BAN., vol. 1 10, n° 3, 1997, páginas 198-201),

la publicación D. SCHUPPAN *ET AL.* se refiere a "Serummarker der Leberfibrose." (DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, vol. 124, n° 41, 15 de octubre de 1999 (1999- 10-1 5), páginas 1213-1218),

G Castaldo, *et. al.* describe el diagnóstico diferencial entre carcinoma hepatocelular y cirrosis mediante una función discriminante basada en resultados para analitos en suero (Clin. Chem., agosto de 1996; 42: 1263 - 1269)

Una publicación en DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, vol. 39, n° 11, 1994, páginas 2426-2432 tiene el título Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis.

55 Los marcadores usados para la evaluación de la fibrosis hepática son PIIINP, laminina, hialuronano, colágeno IV, TIMP-1, tenascina, MMP-2 y fibronectina. Se miden los marcadores y se ha demostrado su capacidad para evaluar la fibrosis hepática. No obstante, los valores de diagnóstico de cada marcador individual no son precisos y específicos para evaluar puntuaciones de fibrosis.

60 Por tanto se tratan combinaciones de marcadores para aumentar el valor de diagnóstico. Se han descrito el índice biológico simple PGA que combina el tiempo de protrombina (TP), gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) sérica y apolipoproteína A1 (Apo A1) y el índice PGAA que incluye alfa-2-macroglobulina (A₂M) al índice PGA para el diagnóstico de enfermedad hepática alcohólica en alcohólicos (7,8). Aunque se han combinado los índices PGA y PGAA con marcadores séricos individuales (9, 10), no se han usado marcadores séricos para establecer algoritmos para la evaluación de enfermedades hepáticas.

En esta invención, se unen marcadores séricos de la matriz extracelular en un panel que conduce a un conjunto de marcadores cuya medición permitirá el cálculo de un algoritmo y el uso de un algoritmo derivado de este tipo para

la predicción de la puntuación histológica de fibrosis hepática. Para este fin se usa análisis de función discriminante para determinar qué variables discriminan entre las puntuaciones de fibrosis diferentes. Los algoritmos se derivan del conjunto de marcadores propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP), colágeno IV, colágeno VI, tenascina, laminina, hialuronano, MMP-2, TIMP-1 y complejo MMP-9/TIMP-1.

Por tanto, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar fibrosis hepática en el que se miden dos o más marcadores de diagnóstico en sangre, suero o plasma y se combinan las mediciones mediante análisis de función discriminante caracterizado porque los marcadores de diagnóstico se seleccionan del grupo de propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP), colágeno IV, colágeno VI, tenascina, laminina, hialuronano, MMP-2, TIMP-1 y complejo MMP-9/TIMP-1 en el que los algoritmos van a usarse para apoyar, predecir o sustituir o aumentar la puntuación histológica de una biopsia de hígado.

En general, todas las técnicas nuevas han de validarse frente a técnicas convencionales actuales, si existe alguna. El “patrón de oro” para evaluar la fibrosis en el hígado es la biopsia de hígado. Con la biopsia, se corta en rodajas algo de tejido extraído aleatoriamente, que se examina por un experto usando un microscopio. Existen muchos problemas asociados con las biopsias de hígado que inducen cierta incertidumbre: distribución de la fibrosis en el hígado (por ejemplo, fibrosis agrupada y la aguja puede haber alcanzado zonas del hígado no afectadas por fibrosis), preparación de muestra fallida (por ejemplo, material tisular insuficiente), y preferencias e individualidad del anatomopatólogo (evaluaciones individuales). Además, normalmente se describe el estado fibrótico del hígado usando puntuaciones y hay muchos sistemas de puntuación diferentes, posiblemente incompatibles (por ejemplo puntuación de Scheuer, puntuaciones de Ishak, etc.).

Por ejemplo, en un estudio con 24 pacientes, dos anatomopatólogos independientes tuvieron que puntuar las mismas muestras de biopsias para cada paciente en dos momentos diferentes usando dos sistemas de puntuación diferentes. El número de evaluaciones en las que los anatomopatólogos obtuvieron resultados idénticos oscilaron solamente desde el 36% hasta el 46%.

La nueva técnica se basa en medir parámetros séricos, que se asocian directamente con el proceso fibrótico, y combinarlos a un nivel matemático dando un procedimiento de evaluación fijo.

Con el fin de validar la nueva técnica, el “patrón de oro” no es el mejor, sino el único medio, debido a que, *a priori*, ambos métodos no investigan criterios de valoración comparables: mientras que los parámetros séricos caracterizan procesos dinámicos, la biopsia caracteriza la manifestación fibrótica en un momento fijo. Puede haber un proceso fibrótico sumamente activo en el hígado aunque el tejido fibrótico no se haya desarrollado aún. Por el contrario, puede haber numerosos grupos de tejido fibrótico en el hígado pero la actividad fibrótica puede haberse parado o interrumpido temporalmente.

En cambio, algunas funciones matemáticas de parámetros séricos dieron valores medios diferentes estadísticamente significativos en fases de puntuación de biopsia diferentes. Se seleccionaron análisis discriminantes usando el “patrón de oro” con el fin de investigar el poder diagnóstico de las funciones matemáticas de parámetros séricos.

La determinación de concentraciones de marcadores séricos y cálculo posterior de un algoritmo puede usarse también para tomar decisiones sobre si debe tomarse o no una biopsia y sobre si debe comenzarse o continuarse o pararse un tratamiento. Por tanto, es ventajoso asignar pacientes a un grupo de puntuaciones de biopsia sin tomar una biopsia. La clasificación de los pacientes en grupos, por ejemplo fibrosis leve frente a grave, usando algoritmos, es un beneficio de la invención descrita.

Descripción de los inmunoensayos

Los marcadores propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP), colágeno IV, colágeno VI, tenascina, laminina, hialuronano, MMP-2, TIMP-1 y complejo MMP-9/TIMP-1 se usan para algoritmos.

Se miden los marcadores utilizando inmunoensayos intercalados (de tipo “sándwich”). Los inmunoensayos de la invención comprenden la reacción de dos anticuerpos con muestras de fluido humano, en la que el anticuerpo de captura se une de manera específica a un epítipo del marcador. El segundo anticuerpo, de diferente especificidad para el epítipo, se usa para detectar este complejo. Preferiblemente los anticuerpos son anticuerpos monoclonales y ambos anticuerpos de dichos dos anticuerpos del ensayo se unen de manera específica a la proteína.

Anticuerpo u otro término similar usado en el presente documento incluye una inmunoglobulina completa o bien monoclonal o bien policlonal, así como fragmentos antigénicos o fragmentos inmunorreactivos que se unen de manera específica al marcador, incluyendo Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). El anticuerpo incluye también proteínas de unión, especialmente la proteína de unión de ácido hialurónico (HABP).

Las muestras de fluido humano usadas en los ensayos de la invención pueden ser cualquier muestra que contenga los marcadores, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, esputo o lavado broncoalveolar (LBA). Normalmente se emplea una muestra de suero o plasma.

ES 2 288 962 T3

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse mediante técnicas conocidas generalmente en la técnica, y se generan normalmente frente a una muestra de los marcadores.

El segundo anticuerpo se conjuga a un grupo detector, por ejemplo fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano o un tinte de fluorescencia. Los conjugados se preparan mediante técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Se mide la concentración de los marcadores en fluidos humanos y se calculan algoritmos para evaluar el grado de fibrosis.

10 Antecedentes estadísticos

Se usa análisis de función discriminante para determinar qué variables discriminan entre dos o más grupos que se producen de forma natural. De manera computacional, es muy similar al análisis de varianza. La idea básica subyacente al análisis de función discriminante es determinar si los grupos se diferencian con respecto a la media de una variable, y entonces usar esa variable para predecir la pertenencia a los grupos (por ejemplo, de nuevos casos). Planteado de esta manera, el problema de función discriminante puede volver a formularse como un problema análisis de varianza (ANOVA) de una vía. De manera específica, puede preguntarse si dos o más grupos son o no significativamente diferentes entre sí con respecto a la media de una variable en particular. Si las medias para una variable son significativamente diferentes en grupos diferentes, entonces puede decirse que esta variable discrimina entre los grupos. En el caso de una única variable, la prueba de significación final de si una variable discrimina o no entre grupos es la prueba F . F se calcula esencialmente como la razón de la varianza entre grupos en los datos con respecto a la varianza dentro de un grupo combinada (promedio). Si la varianza entre grupos es significativamente mayor, entonces debe haber diferencias significativas entre las medias.

Normalmente se incluyen varias variables en un estudio con el fin de ver cuál(es) contribuye(n) a la discriminación entre grupos. En ese caso, se tiene la matriz de las covarianzas y varianzas totales; asimismo, se tiene la matriz de las covarianzas y varianzas dentro de un grupo combinadas. Pueden compararse esas dos matrices mediante pruebas F multivariantes con el fin de determinar si hay o no alguna diferencia significativa (con respecto a todas las variables) entre grupos. Este procedimiento es idéntico al análisis de varianza multivariante o MANOVA. Tal como en MANOVA, puede realizarse en primer lugar la prueba multivariante, y, si es estadísticamente significativa, proceder a ver qué variables tienen medias significativamente diferentes a lo largo de los grupos. Por tanto, incluso si los cálculos con variables múltiples son más complejos, el razonamiento principal todavía se aplica, en concreto, que se están buscando variables que discriminan entre grupos, como es evidente en las diferencias de las medias observadas.

Para un conjunto de observaciones que contienen una o más variables cuantitativas y una variable de clasificación que define grupos de observaciones, el procedimiento de discriminación desarrolla un criterio discriminante para clasificar cada observación en uno de los grupos. La predicción post hoc de qué ha sucedido en el pasado no es tan difícil. No es poco común obtener una clasificación muy buena si se utilizan los mismos casos a partir de los que se calculó el criterio discriminante. Con el fin de hacerse una idea de cómo de bien “funciona” el criterio discriminante actual, deben clasificarse (*a priori*) diferentes casos, es decir, casos que no se utilizaron para estimar el criterio discriminante. Solamente la clasificación de nuevos casos permite evaluar la validez predictiva del criterio discriminante. Con el fin de validar el criterio derivado, puede aplicarse la clasificación a otros conjuntos de datos. El conjunto de datos utilizado para obtener el criterio discriminante se denomina el conjunto de datos de calibración o aprendizaje.

El criterio discriminante (función/funciones o algoritmo) se determina mediante una medición de la distancia cuadrada generalizada. Puede basarse en la matriz de la covarianza combinada dando una función lineal. Puede usarse o bien la distancia de Mahalanobis o bien la distancia euclídea para determinar la proximidad.

Para el desarrollo de un algoritmo discriminante, se analizaron datos de un grupo de sujetos de un estudio de fibrosis hepática de observación. Los sistemas de puntuación de fibrosis hepática bajo observación fueron

- la puntuación de Scheuer (0-4),

- la puntuación de Ishak modificada (HAI) A - Hepatitis de interfase (0-4),

- la puntuación de Ishak modificada (HAI) B - Necrosis confluyente (0-6),

- la puntuación de Ishak modificada (HAI) C - Necrosis irregular (0-4),

- la puntuación de Ishak modificada (HAI) D - Inflamación portal (0-4),

- la puntuación HAI modificada (puntuación de Ishak) (0-6).

Aplicando un análisis discriminante por etapas, por ejemplo las siguientes funciones de parámetros séricos demostraron tener un impacto importante sobre el tipo de puntuación correspondiente.

Tipo de puntuación	Parámetros sustitutos			
Puntuación de Scheuer:	ln (TIMP-1)	ln (colágeno VI /	ln (hialuronano /	
Puntuación de Ishak modificada	ln (TIMP-1)	ln (colágeno VI /	ln (colágeno VI /	
A – hepatitis de interfase:		hialuronano)	hialuronano)	tenascina)
Puntuación de Ishak modificada	ln (hialuronano)	ln (colágeno VI /		
B – necrosis confluyente:		MMP-2)		
Puntuación de Ishak modificada	ln (hialuronano)	ln (complejo		
C – necrosis irregular:		MMP-9/TIMP-1		
Puntuación de Ishak modificada	ln (laminina)	ln (colágeno VI /		
D – inflamación portal		TIMP-1)		
Puntuación de Ishak modificada	ln (TIMP-1)	ln (colágeno VI /	ln (hialuronano /	
– fase:		hialuronano)	laminina)	

Un análisis discriminante correspondiente dio las funciones discriminantes lineales que pueden utilizarse para el cálculo y la predicción de la puntuación de la biopsia. Pueden aplicarse los algoritmos a cada sistema de puntuación conocido (por ejemplo puntuación de Scheuer, puntuación de Ishak, puntuación Metavir, puntuación de Ludwig, puntuación de HAI).

Pueden usarse algoritmos para predecir la puntuación de la biopsia de un paciente (por ejemplo, puntuación 0, 1, 2, 3, ...) o para predecir un grupo de puntuaciones (categoría) al que pertenece un paciente (por ejemplo, fibrosis leve; puntuación de 0 a 1).

Las funciones discriminantes utilizadas incluyen combinaciones de marcadores de la lista de propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP), colágeno IV, colágeno VI, tenascina, laminina, hialuronano, MMP-2, TRAP-1 y complejo MMP-9/TIMP-1 y también factores entre -1000 y +1000.

Diferentes puntuaciones necesitan un algoritmo diferente de la lista de marcadores y factores.

Ejemplos

Ejemplo 1

Algoritmos para la puntuación de Scheuer

Se calcularon los siguientes algoritmos 1, 2 y 3 correlacionando biopsias evaluadas mediante el sistema de puntuación de Scheuer y concentraciones de marcador sérico de un grupo de pacientes con enfermedades hepáticas:

Algoritmo 1:

$$[0] : -108.861 + 0.283 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) - 1.050 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM}) + 35.372 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

$$[1] : -114.231 + 0.195 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) - 0.654 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM}) + 36.158 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

$$[2] : -120.649 - 0.998 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) - 2.102 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM}) + 36.925 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

$$[3] : -123.672 - 1.281 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) - 1.344 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM}) + 37.163 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

$$[4] : -133.207 - 2.186 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) - 1.602 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM}) + 38.188 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

ES 2 288 962 T3

Algoritmo 2:

```
[0] : -75.18797+23.04542*LOG(TIMPI)-0.583641*LOG(COL_VI/HYAL)-0.140956*LOG(HYAL/LAM)
[1] : -76.1526+23.15895*LOG(TIMPI)-0.963402*LOG(COL_VI/HYAL)-0.009472*LOG(HYAL/LAM)
[2] : -78.62662+23.32161*LOG(TIMPI)-1.227332*LOG(COL_VI/HYAL)-0.067969*LOG(HYAL/LAM)
[3] : -83.09285+23.64493*LOG(TIMPI)-2.181493*LOG(COL_VI/HYAL)-0.300241*LOG(HYAL/LAM)
[4] : -93.89732+24.86246*LOG(TIMPI)-2.841299*LOG(COL_VI/HYAL)-0.136885*LOG(HYAL/LAM)
```

Algoritmo 3:

```
[0] : -95.39661+17.66025*LOG(HYAL)-0.820836*LOG(COL_IV)+0.245778*LOG(COL_VI/PIIINP)-
17.79663*LOG(COL_VI/TIMPI)-14.96754*LOG(HYAL/MMP2)-0.279356*LOG(LAM/MMP9T)
[1] : -95.84457+17.62365*LOG(HYAL)-0.667854*LOG(COL_IV)+0.155707*LOG(COL_VI/PIIINP)-
18.0407*LOG(COL_VI/TIMPI)-14.42688*LOG(HYAL/MMP2)-0.554323*LOG(LAM/MMP9T)
[2] : -99.13575+17.76656*LOG(HYAL)-0.978731*LOG(COL_IV)-0.12995*LOG(COL_VI/PIIINP)-
18.69948*LOG(COL_VI/TIMPI)-14.49353*LOG(HYAL/MMP2)-0.647247*LOG(LAM/MMP9T)
[3] : -104.4554+18.38886*LOG(HYAL)-0.202832*LOG(COL_IV)-0.157058*LOG(COL_VI/PIIINP)-
18.70409*LOG(COL_VI/TIMPI)-14.49716*LOG(HYAL/MMP2)-0.340197*LOG(LAM/MMP9T)
[4] : -119.8887+20.14719*LOG(HYAL)+0.999792*LOG(COL_IV)-0.80876*LOG(COL_VI/PIIINP)-
18.69873*LOG(COL_VI/TIMPI)-15.57103*LOG(HYAL/MMP2)-0.229757*LOG(LAM/MMP9T)
```

Se utilizaron los algoritmos para predecir las puntuaciones de la biopsia de un grupo separado de pacientes. Se compararon las puntuaciones calculadas con puntuaciones determinadas por un único anatomopatólogo (caso B), con una puntuación de consenso de 3 anatomopatólogos (caso C) y con el intervalo cubierto por todos los anatomopatólogos (caso A). También se han calculado los valores kappa, valores predictivos negativos (VPN) para la puntuación 0-1, valores predictivos positivos (VPP) para la puntuación 2-4, sensibilidades y especificidades.

(Tabla pasa a página siguiente)

	Algoritmo 1			Algoritmo 2			Algoritmo		
	C	A	B	C	A	B	C	A	B
Tasa de acierto (%) [0]	33,3	38,9	35,0	17,1	40,0	13,7	20,0	41,4	16,8
Tasa de acierto (%) [1]	36,8	42,7	36,0	80,7	81,6	75,8	74,6	77,2	71,7
Tasa de acierto (%) [2]	25,8	42,4	19,0	0,0	36,8	0,0	0,0	34,2	5,1
Tasa de acierto (%) [3]	26,1	34,8	22,2	6,4	17,0	5,2	12,8	21,3	9,3
Tasa de acierto (%) [4]	63,0	63,0	55,9	62,5	62,5	52,9	43,8	43,8	47,1
Tasa de acierto (%) todos	35,9	42,9	33,8	42,2	54,2	36,7	39,5	51,2	36,7
N	468	468	793	301	301	626	301	301	626
Kappa	0,175	0,268	0,151	.	0,199	.	0,124	0,310	0,121
L_Kappa	0,119	0,211	0,109	.	0,134	.	0,056	0,235	0,077
U_Kappa	0,231	0,325	0,192	.	0,265	.	0,191	0,385	0,165
P(Kappa=0)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	.	<0,0001	.	<0,0001	<0,0001	<0,0001
VPN (%) [0-1]	61,6	63,8	62,8	91,8	92,4	85,5	88,0	89,1	81,6
VPP (%) [2-4]	66,1	75,1	66,3	31,6	46,2	35,4	35,0	48,7	39,0
Tasa de acierto (%) todos	63,5	68,4	64,2	68,4	74,4	65,8	67,4	73,4	64,9
Kappa	0,268	0,372	0,280	0,261	0,417	0,226	0,252	0,404	0,219
L_Kappa	0,182	0,291	0,214	0,160	0,315	0,152	0,146	0,299	0,142
U_Kappa	0,354	0,454	0,346	0,363	0,520	0,300	0,358	0,508	0,295
P_(Kappa=0)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Sensibilidad	0,539	0,584	0,540	0,712	0,794	0,613	0,651	0,740	0,578
Especificidad	0,729	0,791	0,739	0,679	0,730	0,671	0,681	0,732	0,674

Ejemplo 2

Algoritmos para la puntuación de Ishak

- 5 Se calcularon los siguientes algoritmos 1, 2 y 3 correlacionando biopsias mediante el sistema de puntuación de Ishak y concentraciones de marcador sérico de un grupo de pacientes con enfermedades hepáticas:

Algoritmo 1:

10 [0] : $-107.752-0.347 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-1.493 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+34.879 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [1] : $-112.550-0.301 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-1.086 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+35.617 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [2] : $-114.626-0.760 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-1.270 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+35.819 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 15 [3] : $-121.339-2.065 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-2.910 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+36.593 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [4] : $-119.289-1.009 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-1.271 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+36.449 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [5] : $-125.551-2.966 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-2.536 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+36.797 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$
 20 [6] : $-133.055-3.256 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-2.329 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})+37.695 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})$

Algoritmo 2:

25 [0] : $-75.94035+23.20826 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-0.911827 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.295297 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 [1] : $-76.0885+23.14058 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-1.221511 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.155608 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 [2] : $-80.17664+23.6506 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-1.41651 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.210415 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 30 [3] : $-79.12945+23.42277 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-1.582733 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.175959 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 [4] : $-83.24617+23.7777 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-2.174834 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.311583 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 [5] : $-89.60186+24.2615 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-3.237993 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.914309 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$
 35 [6] : $-95.5774+25.11333 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1})-3.293235 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL})-0.347014 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$

Algoritmo 3:

40 [0] : $-100.6452+17.18813 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+15.20461 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})+0.515498 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+3.309452 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-15.47806 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-17.50773 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 [1] : $-98.87092+17.18161 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+14.7876 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})+0.530071 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+3.067209 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-14.74001 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-17.62455 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 45 [2] : $-104.8869+17.78543 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+15.25944 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})+0.352181 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+3.175207 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-15.56044 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-17.97986 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 [3] : $-102.8131+17.32281 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+14.69307 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})+0.176959 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+2.82227 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-15.15272 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-18.37351 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 50 [4] : $-109.2574+18.44309 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+15.53464 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})-0.152374 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+2.957847 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-15.02773 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-18.59138 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 55 [5] : $-116.8556+19.00778 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+15.47539 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})+0.436656 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+3.995456 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-15.54302 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-18.53013 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$
 60 [6] : $-127.2084+21.66093 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL})+17.77795 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL})-0.631902 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP})$
 $+3.589129 \cdot \text{LOG}(\text{LAM})-16.1393 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2})-18.40445 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$

Se usaron los algoritmos para predecir puntuaciones de las biopsias de un grupo separado de pacientes. Se compararon las puntuaciones calculadas con las puntuaciones determinadas por un único anatomopatólogo (caso B), con una puntuación de consenso de 3 anatomopatólogos (caso C) y con el intervalo cubierto por todos los anatomopatólogos (caso A). También se han calculado los valores kappa, valores predictivos negativos (VPN) para la puntuación 0-2, valores predictivos positivos (VPP) para la puntuación 3-6, sensibilidades y especificidades.

	Algoritmo 1			Algoritmo 2			Algoritmo 2		
	C	A	B	C	A	B	C	A	B
Tasa de acierto (%) [0]	28,7	31,5	29,5	45,7	58,6	41,0	45,7	57,1	39,8
Tasa de acierto (%) [1]	25,0	34,0	29,2	50,8	60,7	50,8	27,9	41,0	37,7
Tasa de acierto (%) [2]	10,7	24,0	9,7	0,0	22,4	1,1	1,7	15,5	1,1
Tasa de acierto (%) [3]	23,0	27,9	20,2	0,0	3,1	0,0	9,4	12,5	6,9
Tasa de acierto (%) [4]	22,2	37,8	25,6	0,0	0,0	0,0	0,0	7,7	3,3
Tasa de acierto (%) [5]	32,0	44,0	24,4	4,5	18,2	2,6	0,0	18,2	2,6
Tasa de acierto (%) [6]	57,4	57,4	51,1	71,9	71,9	60,9	43,8	43,8	52,2
Tasa de acierto (%) todos	27,1	34,6	27,3	28,9	39,5	28,1	22,3	32,6	25,2
N	468	468	794	301	301	627	301	301	627
Kappa	0,138	0,228	0,136	.	.	.	0,031	0,093	0,041
L_Kappa	0,090	0,177	0,100	.	.	.	-0,02	0,039	0,006
U_Kappa	0,186	0,279	0,173	.	.	.	0,084	0,147	0,076
P_(Kappa=0)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	.	.	.	0,2293	0,0003	0,0152
VPN (%) [0-2]	57,2	59,4	59,1	89,9	91,0	83,9	77,8	80,4	75,1
VPP (%) [3-6]	71,9	79,5	74,2	40,2	50,9	41,5	47,3	55,4	48,1
Tasa de acierto (%) todos	63,0	67,3	65,0	71,4	76,1	67,6	66,4	71,1	64,8
Kappa	0,274	0,362	0,312	0,330	0,450	0,271	0,259	0,366	0,238
L_Kappa	0,191	0,283	0,249	0,223	0,346	0,195	0,147	0,257	0,160
U_Kappa	0,356	0,441	0,374	0,437	0,554	0,347	0,371	0,475	0,316
P(Kappa=0)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Sensibilidad	0,524	0,561	0,537	0,703	0,770	0,617	0,558	0,626	0,547
Especificidad	0,757	0,816	0,781	0,717	0,758	0,697	0,714	0,752	0,699

Ejemplo 3

Curvas características operativas del receptor (COR) para la puntuación de Scheuer

Agrupar a los pacientes en categorías sin fibrosis/con fibrosis leve (puntuación 0-1) y fibrosis moderada/grave (puntuación 2-4) para la puntuación de Scheuer y calcular algoritmos para el resultado dicotómico dio los siguientes resultados:

Algoritmo 4:

LOGIT =

$$7.11957755 - 0.67952658 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1}) + 1.01832374 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) + 0.09461778 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$$

Algoritmo 5:

LOGIT =

$$8.6908419 - 0.76944684 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL}) - 0.47836706 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV}) + 0.43870798 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP}) \\ + 0.74453459 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1}) + 0.05605262 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/MMP2}) - 0.01871531 \cdot \text{LOG}(\text{LAM/MMP9T})$$

Se utilizaron los algoritmos para calcular las curvas características operativas del receptor para las categorías sin fibrosis/con fibrosis leve (puntuación 0-1) y fibrosis moderada/grave (puntuación 2-4) para la puntuación de Scheuer. Se compararon las puntuaciones calculadas con las puntuaciones determinadas por un único anatomopatólogo (caso B), con una puntuación de consenso de 3 anatomopatólogos (caso C) y con el intervalo cubierto por todos los anatomopatólogos (caso A). Se han calculado los valores del área bajo la curva (ABC).

	Algoritmo 4			Algoritmo 5		
	C	A	B	C	A	B
ABC	0,759	0,899	0,759	0,746	0,871	0,756
N	295	295	569	291	291	562

Ejemplo 4

Curvas características operativas del receptor (COR) para la puntuación de Ishak

Agrupar a los pacientes en categorías sin fibrosis/fibrosis leve (puntuación 0-2) y fibrosis moderada/grave (puntuación 3-6) para la puntuación de Ishak y calcular algoritmos para el resultado dicotómico dio los siguientes resultados:

Algoritmo 4:

LOGIT =

$$7.22920269 - 0.68833581 \cdot \text{LOG}(\text{TIMP1}) + 1.04300795 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/HYAL}) + 0.08483109 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL/LAM})$$

Algoritmo 5:

LOGIT =

$$8.92321331 - 1.28340678 \cdot \text{LOG}(\text{HYAL}) - 0.54350583 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/HYAL}) + \\ 0.47836792 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/PIIINP}) + 0.02076678 \cdot \text{LOG}(\text{LAM}) + 0.07719237 \cdot \text{LOG}(\text{COL_IV/MMP2}) \\ + \\ 0.76194671 \cdot \text{LOG}(\text{COL_VI/TIMP1})$$

Se usaron los algoritmos para calcular las curvas características operativas del receptor para las categorías sin fibrosis/fibrosis leve (puntuación 0-2) y fibrosis moderada/grave (puntuación 3-6) para la puntuación de Ishak. Se compararon las puntuaciones calculadas con las puntuaciones determinadas por un único anatomopatólogo (caso B), con una puntuación de consenso de 3 anatomopatólogos (caso C) y con el intervalo cubierto por todos los anatomopatólogos (caso A). Se han calculado los valores del área bajo la curva (ABC).

ES 2 288 962 T3

Algoritmo 4				Algoritmo 5		
	C	A	B	C	A	B
ABC	0,763	0,887	0,763	0,751	0,861	0,757
N	295	295	570	292	292	564

Bibliografía

1. **Friedman** SL The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
2. **Friedman** SL Molecular mechanism of hepatic fibrosis and principle of therapy *J Gastroenterol* 1997; 32: 424-430
3. **Hayasaka** A, Saisho H Serum markers as tools to monitor liver fibrosis *Digestion* 1998; 59: 381-384
4. **Schuppan** D, **Stolzel** U, **Oesterling** C, **Somasundaram** R Serum assays for liver fibrosis. *J Hepatol* 1995; 22 (Supl 2): 82-88
5. **Murawaki** AND, **Ikuta** AND, **Nishimura** AND, **Koda** M, **Kawasaki** H Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis C: A comparative analysis. *J Hepatol* 1995; 23: 145-152
6. **Wong** VS, **Hughes** V, **Trull** A, **Wight** DGD, **Petrik** J, **Alexander** GJM Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection *J Viral Hepatitis* 1998; 5:187-192
7. **Poynard** T, **Aubert** A, **Bedossa** P, **Abella** A, **Naveau** S, **Paraf** F, **Chapu** JCA simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers *Gastroenterology* 1991; 100: 1397-1402
8. **Naveau** S, **Poynard** T, **Benattat** C, **Bedossa** P, **Chaput** J CA α -2 macroglobulin and hepatic fibrosis: diagnostic interest *Dig Dis Sci* 1994; 11: 2426-2432
9. **Oberti** F, **Valsesia** E, **Pilette** C, **Rousselet** MC, **Bedossa** P, **Aube** C, **Gallois** AND, **Rifflet** H, **Maiga** MY, **Penneau-Fontbonne** D, **Cales** P Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis *Gastroenterology* 1997; 113: 1609-1616
10. **Teare** JP, **Sherman** D, **Greenfield** SM, **Simpson** J, **Catterall** AP, **Murray-Lyon** IM, **Peters** TJ, **Williams** R, **Thompson** RPH The *Lancet* 1993; 342: 895-898.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar fibrosis hepática en el que se miden dos o más marcadores de diagnóstico en sangre, suero o plasma y se combinan las mediciones mediante análisis de función discriminante, **caracterizado** porque los marcadores de diagnóstico se seleccionan del grupo de propéptido N-terminal del procolágeno III (PIIINP), colágeno IV, colágeno VI, tenascina, laminina, hialuronano, MMP-2, TIMP-1 y complejo MMP-9/TIMP-1 en el que se usan los algoritmos para apoyar, predecir o sustituir o aumentar la puntuación histológica de una biopsia de hígado.

2. Método según la reivindicación 1, en el que los algoritmos se ajustan para corresponder a un sistema de puntuación conocido (por ejemplo puntuación de Scheuer, puntuación de Ishak, puntuación de HAI, puntuación de Ludwig, puntuación de Metavir).

3. Método según la reivindicación 2, en el que la decisión de tratamiento se apoya en la puntuación calculada o el grupo de puntuaciones calculadas.

4. Método según la reivindicación 2, en el que las decisiones de si debe tomarse una biopsia o no se apoya en la puntuación calculada o el grupo de puntuaciones calculadas.

5. Método según la reivindicación 2, en el que los pacientes se clasifican como que no padecen fibrosis hepática/padecen fibrosis hepática leve o padecen fibrosis hepática moderada/grave.