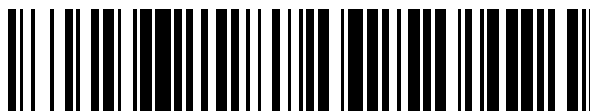


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 424**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 7/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2012 PCT/EP2012/064090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2012 E 12740115 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2734542**

54 Título: **Ensayo de biomarcadores patológicos**

30 Prioridad:

**20.07.2011 US 201113187205**

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

**09.04.2019**

73 Titular/es:

**NORDIC BIOSCIENCE A/S (100.0%)  
Herlev Hovedgade 207  
2730 Herlev, DK**

72 Inventor/es:

**VEIDAL, SANNE S.;  
KARSDAL, MORTEN A.;  
LEEMING, DIANA J.;  
BARASCUK, NATASHA;  
SKJØT-ARKIL, HELENE y  
VASSILIADIS, EFSTATHIOS**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 708 424 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

Ensayo de biomarcadores patológicos

- 5 La presente invención se refiere a ensayos para biomarcadores útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades incluyendo enfermedades de fibrosis y el pronóstico de su desarrollo, incluidos biomarcadores indicativos del riesgo de desarrollar una enfermedad, por ejemplo, el riesgo de desarrollar una fibrosis después de una lesión crónica. Los biomarcadores para enfermedades inflamatorias tal como la espondilitis anquilosante, también se describen como biomarcadores para enfermedades cardiovasculares (ECV).
- 10 En particular, de acuerdo con la presente invención, se encuentran útiles biomarcadores relacionados con fragmentos de degradación de Colágeno de tipo I, III, IV, V y VI, elastina, proteína C reactiva, ApoE, lumicano, LAMC1, LAMB1, LAMA5 y proteoglicanos, incluyendo Biglicano, Decorina, Versicano y Perlecano.
- 15 Las enfermedades fibróticas (incluidas las enumeradas en la Tabla 1) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, por ejemplo, cirrosis con 800.000 muertes al año en todo el mundo<sup>1</sup>.

Tabla 1. Diferentes enfermedades fibróticas<sup>2</sup>

| Tejido                 | Ejemplos de causas                                                                                                                 |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hígado                 | Hepatitis viral                                                                                                                    |
|                        | Esquistosomiasis                                                                                                                   |
|                        | Esteatohepatitis (alcohólica o no alcohólica)                                                                                      |
| Pulmón                 | Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)                                                                                                 |
|                        | Esclerosis sistémica (esclerodermia)                                                                                               |
| Riñón                  | Fibrosis sistémica nefrogénica (FSN)                                                                                               |
|                        | Diabetes                                                                                                                           |
|                        | Hipertensión no tratada                                                                                                            |
| Corazón                | Ataque cardíaco                                                                                                                    |
|                        | Hipertensión                                                                                                                       |
|                        | Aterosclerosis                                                                                                                     |
|                        | Reestenosis                                                                                                                        |
| Ojo                    | Degeneración macular, retinopatía retiniana y vítrea                                                                               |
| Piel                   | Esclerosis sistémica y esclerodermia, queloides, cicatrices hipertróficas, quemaduras, factores genéticos NFS                      |
| Páncreas               | Enfermedades autoinmunes/hereditarias                                                                                              |
| Intestino              | Enfermedad de Crohn/Enfermedad inflamatoria intestinal                                                                             |
| Cerebro                | Enfermedad de Alzheimer, sida                                                                                                      |
| Médula ósea            | Cáncer, envejecimiento                                                                                                             |
| Fibrosis multiorgánica | Complicaciones quirúrgicas, fibrosis inducida por fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación, lesiones mecánicas |

- 20 Una "enfermedad fibrótica" es cualquier enfermedad que da lugar a fibrosis, ya sea como síntoma principal o secundario.

- La fibrosis es el resultado final de reacciones inflamatorias crónicas inducidas por una diversidad de estímulos incluyendo infecciones persistentes, reacciones autoinmunes, respuestas alérgicas, insultos químicos, radiación y lesión tisular. La fibrosis se caracteriza por la acumulación y reorganización de la matriz extracelular (MEC). A pesar de tener obvias distinciones etiológicas y clínicas, la mayoría de los trastornos fibróticos crónicos tienen en común un irritante persistente que sostiene la producción de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogénicas, que en conjunto estimulan la deposición de elementos del tejido conectivo, especialmente colágenos y proteoglicanos, que remodelan y destruyen progresivamente la arquitectura tisular normal<sup>3, 4</sup>. A pesar de su enorme impacto en la salud humana, actualmente no hay tratamientos aprobados que aborden directamente los mecanismos de la fibrosis<sup>5</sup>.

- El mediador celular clave de la fibrosis es el miofibroblasto, que cuando se activa sirve como la célula primaria productora de colágeno.

35

#### Afecciones inflamatorias

La espondilitis anquilosante (AS) es una forma de inflamación crónica de la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas. Con el tiempo, la inflamación crónica de la columna vertebral puede llevar a una cementación completa de las vértebras (110), un proceso con una patología molecular que aún debe investigarse y entenderse completamente. La AS es también una enfermedad sistémica que afecta a otros tejidos del cuerpo, incluida la inflamación o lesión de otras articulaciones, así como a los órganos tal como los ojos, el corazón, los pulmones y los riñones (111). Los procesos relacionados con la inflamación en la AS, que implican múltiples tejidos, parecen implicar procesos moleculares que incluyen un aumento de la actividad de MMP y la deposición de colágeno, lo que se observa en la mayoría de los tipos de renovación del tejido conectivo.

La remodelación de la matriz extracelular (MEC) es un proceso clave de la homeostasis del tejido (112, 113). Las actividades proteolíticas específicas son un requisito previo para una serie de funciones e interacciones celulares dentro de la MEC (114). Estas actividades específicas se coordinan con precisión en situaciones fisiológicas normales, con una secuencia específica de eventos que dan como resultado una renovación tisular controlada. En situaciones patológicas, con especial énfasis en las enfermedades del tejido conectivo, la relación normal de reparación-respuesta se ve alterada (115), lo que conduce a una remodelación excesiva y a la renovación tisular. La consecuencia de esta remodelación de la MEC es la liberación de una gama de productos de degradación de proteínas, neo-epítomos, generados por las proteasas expresadas localmente en el área patológicamente afectada. Estos fragmentos de degradación de proteínas pueden servir como dianas de biomarcadores moleculares, ya que son más específicos para el tejido de origen en comparación con sus orígenes intactos (116).

Las endopeptidasas, tales como las metaloproteinasas de matriz (MMP), desempeñan un papel importante en la degradación de proteínas de la MEC como colágenos y proteoglicanos (117, 118). En particular, en enfermedades del tejido conectivo, tal como la fibrosis, se ha demostrado que MMP-2 y -9 están muy reguladas positivamente (119-121). Recientemente, los marcadores bioquímicos basados en neo-epítomos encontrados en la orina y el suero han recibido mayor atención por su potencial diagnóstico y pronóstico (116). En particular para enfermedades de progreso lento, tal como osteoporosis y osteoartritis, los marcadores de reabsorción ósea y de degradación del cartílago, basados en productos de degradación del colágeno de tipo I y II, respectivamente, se han estudiado ampliamente (122).

### **Matriz Extracelular (MEC)**

La fibrogénesis es un proceso dinámico que implica mecanismos celulares y moleculares complejos que normalmente se originan en la lesión tisular<sup>6</sup>. La fibrogénesis es el resultado de un desequilibrio en la regulación de la MEC normal que altera la concentración de macromoléculas lo que conduce a un aumento del tamaño y la densidad del tejido, con una función progresivamente alterada. Estas macromoléculas son principalmente proteínas fibrosas con funciones estructurales y adhesivas, tales como colágenos y proteoglicanos.

### **Colágeno**

Los colágenos se distribuyen de manera amplia en el cuerpo humano, es decir, ~30 % de la masa de proteínas en el cuerpo humano está compuesta por colágenos. Los colágenos son responsables de la integridad estructural de la MEC de la mayoría de los tejidos conectivos. El contenido de la MEC es resultado de un fino equilibrio entre la síntesis y la degradación que se controla estrechamente mediante la regulación de la expresión génica y la secreción de proteínas, pero también a través de la inhibición endógena de las proteasas y la degradación de las proteínas por las metaloproteinasas y las proteasas de cisteína<sup>7-9</sup>. La Tabla 2 enumera los principales tipos de colágeno con su principal distribución tisular.

Tabla 2. Principales tipos de colágeno y su distribución tisular.

| Tipo de colágeno | Distribución tisular                                                                |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| I                | Mayoría de los tejidos conectivos                                                   |
| II               | Cartílago, humor vítreo                                                             |
| III              | Tejidos conectivos extensibles, por ejemplo, hígado, piel, pulmón, sistema vascular |
| IV               | Membranas basales                                                                   |
| V                | Tejidos que contienen colágeno I                                                    |
| VI               | Mayoría de los tejidos conectivos                                                   |
| VII              | Piel, vejiga, mucosa oral, cordón umbilical, amnios                                 |
| VIII             | Muchos tejidos, especialmente el endotelio                                          |
| XIII             | Células endoteliales, piel, ojos, corazón, músculo esquelético                      |

| Tipo de colágeno | Distribución tisular                                             |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| XIV              | Vasos, hueso, piel, cartílago, ojos, nervios, tendones, útero    |
| XXI              | Vasos, corazón, estómago, riñones, músculo esquelético, placenta |

El colágeno de tipo I es el colágeno más abundante y se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos. Es especialmente importante para la estructura de los huesos y de la piel donde los principales componentes de colágeno son los colágenos de tipo I y III<sup>10</sup>.

5

Los colágenos tipo I y III son los principales componentes del hígado y del pulmón en una relación 1:1 en los tejidos sanos. Adicionalmente, los colágenos tipo IV y VI se encuentran en las membranas basales en la mayoría de los tejidos. La localización más frecuente del colágeno de tipo V es dentro de las fibrillas de colágeno características, en asociación con los colágenos de tipo I y III<sup>10</sup>.

10

Algunos colágenos tienen una distribución tisular restringida: por ejemplo, el de tipo II, que se encuentra casi exclusivamente en el cartílago<sup>11</sup>.

Durante la fibrogénesis la cantidad neta de colágeno aumenta<sup>12-14</sup>. La Tabla 3 muestra, en forma de ejemplo, el aumento de colágeno durante la fibrosis hepática.

15

Tabla 3. Cambios de la composición de colágeno entre el hígado humano normal y el cirrótico<sup>15</sup>.

| Tipo de colágeno | Cadenas         | Colágeno del hígado normal (mg/g) | Colágeno del hígado cirrótico (mg/g) | Veces que aumentó | Distribución en el hígado normal (%) | Distribución en el hígado cirrótico (%) |
|------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| I                | $\alpha_1(I)$   |                                   | 16                                   | 8                 | 37                                   | 42                                      |
|                  | $\alpha_2(I)$   | 2                                 |                                      |                   |                                      |                                         |
| III              | $\alpha_1(III)$ | 2                                 | 8                                    | 4                 | 37                                   | 21                                      |
| IV               | $\alpha_1(IV)$  | 0,5                               | 7                                    | 14                | 9                                    | 18                                      |
|                  | $\alpha_2(IV)$  |                                   |                                      |                   |                                      |                                         |
| V                | $\alpha_1(V)$   | 0,9                               | 7                                    | 8                 | 17                                   | 18                                      |
|                  | $\alpha_2(V)$   |                                   |                                      |                   |                                      |                                         |
|                  | $\alpha_3(V)$   |                                   |                                      |                   |                                      |                                         |
| VI               | $\alpha_1(VI)$  | 0,01                              | 0,1                                  | 10                | 0,2                                  | 0,3                                     |
|                  | $\alpha_2(VI)$  |                                   |                                      |                   |                                      |                                         |

Se ha documentado que el colágeno de tipo V es críticamente importante para la formación de fibrillas de colágeno (123), ilustrado por una falta casi virtual de formación de fibrillas de colágeno en los ratones *col5a1<sup>-/-</sup>*. Durante la alineación, los ratones heterocigotos se asociaron con una reducción del 50% en el número de fibrillas y el contenido de colágeno dérmico. Esto indica un papel central para el colágeno de tipo V en la regulación dependiente de la vida de la fibrillogénesis, lo que sugiere que este tipo de colágeno es de interés fundamental en muchas enfermedades conectivas. Sin embargo, todavía hay una falta conceptual de comprensión del papel de la renovación de colágeno de tipo V en las enfermedades conectivas que puede deberse en parte a las incapacidades técnicas para la investigación de la degradación y la renovación del colágeno de tipo V. De forma interesante, muy recientemente, se encontró que un conjunto diverso limitado de proteínas se unía al colágeno de tipo V, comenzando a dilucidar la función molecular de esta molécula con más detalles, de las cuales la MMP-2 era una de ellas (124). Además de la caracterización molecular, está surgiendo más evidencia de que el colágeno de tipo V afecta directamente a diferentes fenotipos celulares al inducir la motilidad dinámica y otras actividades celulares, lo que sugiere que estas proteínas pueden ser más que un componente pasivo de la MEC (125, 126). En apoyo directo de esto, recientemente se describió una correlación muy fuerte con la fibrosis hepática con la formación de colágeno de tipo V en dos modelos animales separados de fibrosis hepática (127), lo que sugiere un papel central de la formación de colágeno de tipo V en la renovación excesiva de tejido.

35

El colágeno de tipo V es un colágeno formador de fibrillas, junto con los tipos I, II, III y XI (11), y se forma como heterotrímeros de tres cadenas  $\alpha$  diferentes ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ). Típicamente forma heterofibrillas con colágenos de tipo I y III y contribuye a la matriz ósea orgánica, el estroma corneal y la matriz intersticial de músculos, hígado, pulmones y placenta (128). La mutación del colágeno de tipo V produce una variedad de enfermedades del tejido conectivo, de las cuales el síndrome de Ehlers-Danlos (EDS) es el mejor descrito. El EDS es un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios caracterizados por hipermovilidad articular, cambios en la piel (por ejemplo, hiperextensibilidad, delgadez y fragilidad). La enfermedad se puede dividir en diferentes subtipos, EDS 1 y II. Los tipos de EDS I y II se caracterizan por cicatrices atróficas, hiperextensibilidad de la piel y laxitud de las articulaciones. Es evidente que

40

ambos subtipos son resultado de mutaciones en los genes COL5A1 y COL5A2 que codifican dos de las cadenas polipeptídicas del colágeno de tipo V (129-131). Esto destaca la importancia del colágeno de tipo V en las enfermedades de los tejidos conectivos.

## 5 **Elastina**

La elastina es una proteína presente en muchos tejidos conectivos, fundamentalmente en los que son elásticos. Tiene un muy alto contenido de los aminoácidos glicina, valina, alanina y prolina, y tiene un peso molecular de 64 a 66 kDa. Se organiza en una conformación helicoidal irregular o al azar compuesta por 830 aminoácidos. La elastina se elabora mediante el enlace de muchas moléculas solubles de la proteína tropoelastina, en una reacción que se cataliza por la lisiloxidasas, para elaborar una matriz reticulada duradera, insoluble masiva.

La elastina cumple una importante función en las arterias como un medio para la propagación de la onda de presión para ayudar al flujo sanguíneo y es particularmente abundante en los grandes vasos sanguíneos elásticos tales como la aorta. La elastina es también muy importante en los pulmones, los ligamentos elásticos y la piel.

A pesar de muchos esfuerzos que se dedican a la comprensión de la síntesis y la renovación de la elastina, los neo-epítomos procedentes de la escisión proteolítica de estas moléculas de la matriz no han asociado hasta ahora con el desarrollo de la enfermedad en la fibrosis.

## **Vimentina**

La vimentina es un miembro de la familia de proteínas de filamentos intermedios. Los filamentos intermedios son una importante característica estructural de las células eucariotas. Junto con los microtúbulos y microfilamentos de actina, constituyen el citoesqueleto. Aunque la mayoría de los filamentos intermedios son estructuras estables, en los fibroblastos, la vimentina existe como una estructura dinámica. Este filamento se utiliza como un marcador de los tejidos que se derivan del mesodermo, y como tal se utiliza como un marcador inmunohistoquímico para los sarcomas.

Hertig y colaboradores (Hertig et al., J Am Soc Nephrol. 2008 Aug;19(8):1584-91) investigaron si la transición epitelial a mesenquimal en las células epiteliales tubulares renales de pacientes con nefropatía crónica de aloinjerto podía predecir la progresión de la fibrosis en el aloinjerto y midieron la expresión de vimentina en 83 biopsias de estos. Encontraron una asociación entre la expresión elevada de la vimentina y la puntuación de la fibrosis intestinal 1 año después de la cirugía.

En otro estudio de la fibrosis hepática, Meriden y colaboradores (Meriden et al., Clin Gastro & Hepatol 2010; 8:289-296) encontraron una asociación significativa entre la expresión de la vimentina (en biopsias que se obtuvieron en el estadio F0) y la progresión de la fibrosis, donde los niveles elevados predijeron la rápida progresión de la fibrosis hepática.

Por consiguiente, se quiso investigar si los fragmentos de vimentina circulantes podrían servir como biomarcadores sensibles y específicos de la fibrosis.

## **Proteoglicanos**

Los proteoglicanos son un grupo diverso de macromoléculas, que unen covalentemente un número variable de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAG) a una proteína nuclear<sup>16</sup>. Estos GAG son polímeros de repeticiones de disacárido (por ejemplo, N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina), que son ácidos (cargados negativamente) debido a los grupos laterales hidroxilo, carboxilados y sulfatados en las unidades de disacárido. Esto los hace altamente hidrófilos, facilitando de este modo la difusión del agua y los iones positivos (por ejemplo, el sodio de los fluidos extracelulares)<sup>17</sup>. Además, los GAG tienen la capacidad de formar enlaces no covalentes con, por ejemplo, las cadenas de ácido hialurónico para formar complejos moleculares aún mayores<sup>16</sup>. La Tabla 4 enumera los proteoglicanos más estudiados que se asocian con el tejido conectivo.

Tabla 4. Proteoglicanos de la matriz extracelular del tejido conectivo

| Grupo                                                                                             | Proteoglicanos              | Origen                                                                                       | Función                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proteoglicanos extracelulares grandes ( <i>mediante la agregación y la unión de hialuronano</i> ) | Agrecano <sup>18</sup>      | Condrocitos del cartílago articular, disco intervertebral, cartílago nasal                   | Estabilidad de la matriz extracelular (unión de hialuronano)                                                           |
|                                                                                                   | Versicano <sup>19, 20</sup> | Tejido conectivo: fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso, células mesangiales | Interacciones célula-célula y célula-matriz Unión de azúcares de forma dependiente de Ca                               |
|                                                                                                   | Neurocano <sup>21</sup>     | Tejido nervioso                                                                              | Se une a las moléculas de adhesión de las células neuronales                                                           |
|                                                                                                   | Brevicano <sup>22</sup>     | Tejido nervioso                                                                              | Estabilidad de la matriz extracelular                                                                                  |
| Proteoglicanos pequeños ricos en leucina ( <i>unión a colágeno</i> )                              | Decorina <sup>23</sup>      | Tejido conectivo, cartílago, hueso                                                           | Se une a y conecta las moléculas de colágeno (estabilización de la matriz y espesor) Unión en la organogénesis de TGFβ |
|                                                                                                   | Biglicanos <sup>24</sup>    | Endotelio capilar, piel (queratinocitos), epitelio del riñón                                 | La diferenciación celular Une y conecta las fibrillas de colágeno                                                      |
|                                                                                                   | Fibromodulina <sup>17</sup> | Tejido conectivo, hueso, cartílago                                                           | Orientación regulada de las fibras de colágeno                                                                         |
|                                                                                                   | Lumicano <sup>23</sup>      | Cornea, músculo, cartílago, riñón, pulmón, intestino                                         | Controla el espaciado y el espesor de las fibras de colágeno                                                           |
| Proteoglicanos asociados a células                                                                | Serglicinas <sup>25</sup>   | Ampliamente distribuidas a los compartimientos intercelulares del endotelio                  | Diferenciación de las células hematopoyéticas Adhesión y activación de las células linfoides                           |
|                                                                                                   | Sindecanos <sup>26</sup>    | Ampliamente distribuidos - a menudo unidos a la membrana celular                             | Une colágenos, fibronectina, trombospondina, tenascina y bFGF                                                          |
|                                                                                                   | Betaglicano <sup>27</sup>   | Ampliamente distribuido                                                                      | Receptor de TGFβ y señalización Posible reservorio de TGFβ                                                             |
| Proteoglicanos de la membrana basal                                                               | Perlecano <sup>28</sup>     | Todas las membranas basales                                                                  | Barrera selectiva para macromoléculas                                                                                  |

### PROTEÍNA C REACTIVA

5 La proteína C reactiva (CRP) es una proteína sérica de la fase aguda que se produce por el hígado en respuesta a diferentes afecciones clínicas tales como, inflamación, infección o trauma<sup>29</sup>. La producción de CRP se induce por citocinas, tal como IL-6, que se libera de los tejidos afectados o dañados. El papel fisiológico de la CRP se desconoce aún y están en curso análisis sobre su acción pro o antiinflamatoria.

### 10 APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E (APOE) es una clase de apolipoproteína que se encuentra en el quilomicrón (partículas grandes de lipoproteínas) y partículas de lipoproteínas de densidad intermedia que se unen a receptores específicos en células hepáticas y células periféricas. Es esencial para el catabolismo normal de los constituyentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos. La APOE tiene una longitud de 299 aminoácidos y transporta lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol al sistema linfático y luego a la sangre. Se sintetiza principalmente en el hígado, pero también se ha encontrado en otros tejidos tal como el cerebro, los riñones y el bazo. La APOE es esencial para el catabolismo normal de los constituyentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos. La APOE fue reconocida inicialmente por su importancia en el metabolismo de las lipoproteínas y las enfermedades cardiovasculares.

20

### ELASTINA

La elastina es la molécula de la matriz extracelular responsable de la resiliencia de los tejidos y se pensó primero que estaba restringida a ese papel. Ahora se ha establecido que la degradación de la elastina puede conducir a la producción de péptidos bioactivos que influyen en la quimiotaxis celular, la proliferación celular y la síntesis de proteasas en un amplio panel de células normales y tumorales.

25

**LAMC1, LAMA2, LAMB1, y LAMA5**

Las lamininas, una familia de glucoproteínas de matriz extracelular, son el principal constituyente no colágeno de las membranas basales. Se han visto implicadas en una amplia diversidad de procesos biológicos que incluyen adhesión celular, diferenciación, migración, señalización, crecimiento de neuritas y metástasis. Las lamininas están compuestas por 3 cadenas no idénticas: laminina alfa, beta y gamma (antes A, B1 y B2, respectivamente), y forman una estructura cruciforme que consiste en 3 brazos cortos, cada uno formado por una cadena diferente, y un brazo largo compuesto por las 3 cadenas. Cada cadena de laminina es una proteína multidominio codificada por un gen distinto. Se han descrito varias isoformas de cada cadena. Diferentes isómeros de cadena alfa, beta y gamma se combinan para dar lugar a diferentes isoformas heterotriméricas de laminina, que se designan mediante números arábigos en el orden de su descubrimiento. Las funciones biológicas de las diferentes cadenas y moléculas triméricas son en gran parte desconocidas, pero se ha demostrado que algunas de las cadenas difieren con respecto a su distribución tisular, probablemente reflejando diversas funciones *in vivo*.

LAMC1 (antes LAMB2) es la subunidad de laminina gamma-1.

LAMA2 es la subunidad de laminina alfa-2

LAMB1 es la subunidad de laminina beta-1

LAMA5 es la subunidad de laminina alfa-5

**Proteasas**

El desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC durante la fibrogénesis, es resultado de la conversión de la matriz subendotelial de baja densidad en la matriz rica en colágenos intersticiales. El aumento de colágeno y proteoglicanos puede deberse a uno o ambos de (1) una disminución en la producción de la proteína y (2) la alteración de la degradación de proteínas, y por lo tanto, menos degradación de la matriz. La disminución de la degradación de proteínas recibe recientemente mayor atención. En la regulación de este proceso las metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores tisulares (TIMP) desempeñan funciones importantes, así como otras proteasas y sus inhibidores, tales como las cisteína proteasas y las cistatinas.

**MMP**

Las MMP son un grupo grande de endopeptidasas, capaces de degradar la mayoría, sino todos, los componentes de la MEC. Actualmente, se encontraron más de 25 MMP. Las MMP se caracterizan por un sitio activo que contiene un átomo de metal, típicamente cinc, y se secretan como zimógenos. Se expresan diferentes MMP en diferentes tejidos. En la Tabla 5 se muestran las MMP en el hígado.

Tabla 5. MMP en el hígado<sup>30-32</sup>

| Familia        | Proteasa | Origen       | Sustrato                                                                                                                                     |
|----------------|----------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colagenasas    | MMP-1    | HSC          | I, II, III, VII, VIII, X, gelatina                                                                                                           |
|                | MMP-8    | Neutrófilo   | I, II, III, V, VII, X, gelatina                                                                                                              |
|                | MMP-13   | HSC, MFB, KC | I, II, III, VII, X, gelatina                                                                                                                 |
| Estromelisin   | MMP-3    | HSC          | III, IV, V, IX, X, XI, gelatina, laminina, fibronectina, proteoglicanos, glucoproteínas, elastina, pro-MMP-1/13                              |
|                | MMP-10   | HSC          | III, IV, V, gelatina, elastina, agregano                                                                                                     |
|                | MMP-11   | HC           | PAI-1, actividad semanal frente a las proteínas de matriz                                                                                    |
| Gelatinasas    | MMP-2    | HSC, MBF     | I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, laminina                                                                                  |
|                | MMP-9    | KC, HSC, HC  | I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, elastina, laminina                                                                                  |
|                | MMP-7    | HSC          | Entactina, gelatina, elastina, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno                                                             |
| Metaloelastasa | MMP-12   | Macrófagos   | Elastina, gelatinas, IV, laminina, fibronectina, entactina, vitronectina, proteoglicano, proteína básica de mielina, $\alpha$ 1-antitripsina |
| MT-MMP         | MMP-14   | HSC, MFB, KC | I, II, III, gelatina, fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinógeno, pro-MMP-2, pro-MMP-13                                               |

MMP-15 HC, BDEC Pro-MMP-2, fibronectina, tenascina, laminina, agrecano, perlecano

Las TIMP bloquean la actividad proteolítica de las MMP mediante la unión a la MMP de manera específica del sustrato y el tejido y la metaloproteínasa de membrana tipo 1 en un complejo trimolecular (Tabla 6). Durante la fibrosis, los niveles de TIMP aumentan drásticamente, y los niveles de MMP aumentan modestamente o se mantienen relativamente estáticos (excepto los de la MMP-2), lo que en conjunto da una disminución de la degradación de los colágenos.

Tabla 6. TIMP en el hígado<sup>31</sup>

| Nombre | Orígenes         | Metaloproteínasa inhibida                          |
|--------|------------------|----------------------------------------------------|
| TIMP-1 | HSC, MFB, KC, HC | Pro-MMP-9, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13             |
| TIMP-2 | KC, HSC          | MT-MMP-1, MT-MMP-2, proMMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-7 |
| TIMP-3 | HC               | MT-MMP-1, MT-MMP-2, TACE, MMP-13                   |

#### 10 **Proteína de activación de fibroblastos**

La subunidad alfa de la proteína de activación de fibroblastos (FAPa o FAP, alfa) es una gelatinasa integral de membrana que pertenece a la familia de las serina proteasas. La FAPa es la subunidad alfa y la DPP4 (CD26) la subunidad beta de un complejo de proteinasa heterodimérico unido a la membrana que se conoce también como Gelatinasa de Membrana de Melanoma 170 kDa, Serina Proteinasa Integral de Membrana y Seprasa. Algunas células sólo producen homodímeros de FAPa, algunas sólo homodímeros de DPP4. El monómero está inactivo. La FAP, alfa se expresa de manera selectiva en los fibroblastos del estroma reactivo de los cánceres epiteliales, el tejido de granulación de la cicatrización de heridas, y las células neoplásicas de los sarcomas óseos y de los tejidos blandos<sup>33</sup>. Se cree que esta proteína participa en el control del crecimiento de los fibroblastos o en las interacciones mesenquimales-epiteliales durante el desarrollo, la reparación tisular, y la carcinogénesis epitelial. Se demostró que la expresión de FAP aumenta con el estadio de la fibrosis<sup>34, 35</sup>.

#### **ADAMTS**

La ADAMTS (una desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospodina (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*)) es una familia de peptidasas, y hasta ahora se han identificado 19 miembros de esta familia en seres humanos. Las funciones conocidas de las proteasas ADAMTS incluyen el procesamiento de procolágenos y el factor de von Willebrand, así como la escisión de agrecano, versicano, brevicano y neurocano. Se ha demostrado que tienen importantes funciones en la organización del tejido conectivo, la coagulación, la inflamación, la artritis, la angiogénesis y la migración celular.

#### **Catepsinas**

Existen aproximadamente una docena de miembros de la familia de catepsinas de proteasas, que se distinguen por su estructura, mecanismo catalítico, y qué proteínas escinden. La mayoría de los miembros se activan con el bajo pH que se encuentra en los lisosomas. Por lo tanto, la actividad de esta familia se encuentra casi en su totalidad dentro de esos orgánulos (aunque hay muchas excepciones). Tal como la catepsina K, que (entre otras actividades) funciona extracelularmente después de la secreción por osteoclastos en la resorción ósea.

La catepsina K (CAT K) y la catepsina S (CAT S) son ambas proteasas de cisteína.

#### **Biomarcadores de fibrosis**

Se han sugerido varios marcadores bioquímicos para las enfermedades fibróticas, aunque no es un producto específico de la enfermedad. En la Tabla 7 se muestra un ejemplo de los marcadores bioquímicos de la fibrosis hepática utilizados en un ensayo clínico. Adicionalmente hay numerosos ejemplos de biomarcadores de otras enfermedades fibróticas<sup>12, 36-42</sup>.

La Tabla 7 resume algunos de los marcadores conocidos de la fibrosis hepática.

| Biomarcador         | Parámetros | Enfermedad hepática crónica | Referencia |
|---------------------|------------|-----------------------------|------------|
| <b>Un parámetro</b> |            |                             |            |
| CRP                 |            | NASH                        | 43         |
| Hialuronano         |            | VHC                         | 44-47      |

|                                      |                                                                                                                                                                                                |                                             |                               |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
| IGF-I                                |                                                                                                                                                                                                | VHC                                         | 48                            |
| Leptina                              |                                                                                                                                                                                                | VHC                                         | 49                            |
| PIIIP                                |                                                                                                                                                                                                | VHC                                         | 50                            |
| <b>Varios parámetros</b>             | <b>Parámetros</b>                                                                                                                                                                              | <b>Enfermedad hepática crónica</b>          | <b>Referencias</b>            |
| MP3                                  | PIIINP, MMP1                                                                                                                                                                                   | VHC                                         | 51, 52                        |
| Índice de Zheng et al                | HA, PIIICP, PIIINP, Laminina, C-IV                                                                                                                                                             | Hepatitis crónica                           | 53                            |
| Índice de Lebensztjen et al          | Laminina-2, C-IV, MMP2, MMP9-TIMP1                                                                                                                                                             | VHB                                         | 54                            |
|                                      | Tenascina, hialuronano, Colágeno VI, TIMP-1                                                                                                                                                    | VHB                                         | 55                            |
| Índice de Tsochatzis et al           | Leptina, adiponectina, resistina                                                                                                                                                               | VHC, HBC, NASH                              | 56                            |
| Índice de Patel et al                | Hialuronano, TIMP-1, $\alpha_2$ -macroglobulina                                                                                                                                                | VHC                                         | 57                            |
|                                      | TIMP-1, tenascina, colágeno IV, PIIINP, MMP2, laminina, Hialuronano                                                                                                                            | NASH                                        | 58                            |
| Índice de Forns (76, 77)             | Edad, recuento plaquetario, $\gamma$ GT, colesterol                                                                                                                                            | VIH por VHC/VHC                             | 51, 59-62                     |
| FibroTest (76, 78)                   | Haptoglobina, $\alpha_2$ -macroglobulina, apolipoproteína A1, $\gamma$ GT, bilirubina                                                                                                          | VIH VHC/VHC NAFLD en pacientes con diabetes | 45, 51, 60, 61, 63-75         |
| Actitest                             | FibroTest + ALT                                                                                                                                                                                | VHC                                         | 65, 76-78                     |
| APRI (índice de Wai)                 | AST, recuento plaquetario                                                                                                                                                                      | VIH/VHC NAFLD por VHC                       | 45, 51, 60, 61, 64, 66, 79-87 |
| Hepascore                            | Bilirubina, $\gamma$ GT, hialuronano, $\alpha_2$ -macroglobulina, edad, género                                                                                                                 | VIH por VHC/VHC                             | 51, 61, 64, 66, 88            |
| FIB-4                                | Recuento plaquetario, AST, ALT, edad                                                                                                                                                           | VIH/VHC                                     | 61, 83                        |
| SHASTA                               | Hialuronano, albúmina, AST                                                                                                                                                                     | VIH/VHC                                     | 61                            |
| Fibroindex                           | FORN+APRI                                                                                                                                                                                      | VHC                                         | 89                            |
| Prueba de Fibrometer                 | Recuento plaquetario, índice de protrombina, AST, $\alpha_2$ -macroglobulina, hialuronano, urea, edad                                                                                          | VIH/VHC NAFLD por VHC                       | 51, 61, 64, 66, 81            |
| NFSA                                 | Edad, hiperglucemia, índice de masa corporal, plaquetas, albúmina, AST/ALT                                                                                                                     | NAFLD                                       | 81                            |
| Ultrasonido + APRI                   |                                                                                                                                                                                                | VHC                                         | 82                            |
| Índice de Metwally et al             | Recuento plaquetario, albúmina, AST, antecedentes de transfusión sanguínea, anticuerpo nuclear del VHC                                                                                         | VHC                                         | 90                            |
| Índice de Mohamadnejad et al         | Edad, niveles de ADN en VHB, fosfatasa alcalina, albúmina, recuentos plaquetarios, AST                                                                                                         | VHC                                         | 91                            |
| FibroSpect II                        | Hialuronano, TIMP-1, $\alpha_2$ -macroglobulina                                                                                                                                                | VHC                                         | 85, 92, 93                    |
| Algoritmos de combinación por etapas | Combinación de APRI y Fibrotest                                                                                                                                                                | VHC                                         | 94                            |
| Índice de Imbert-Bismut              | $\alpha_2$ macroglobulina, AST, ALT $\gamma$ GT, bilirubina total, albúmina, $\alpha_1$ globulina, $\alpha_2$ globulina, $\beta$ globulina, $\gamma$ globulina, apolipoproteína A <sub>1</sub> | VHC                                         | 95                            |
| Nunes et al                          | Edad, plaquetas, INR, CD4, AST/ALT, Hialuronano, YKL-40, PIIINP                                                                                                                                | VHC/VIH VHC                                 | 96                            |
| Fibroscan +++                        | Fibroscan, Fibrotest, APRI,                                                                                                                                                                    | VHC                                         | 97                            |

El documento US5387504 describe el neo-epítipo VDIPEN liberado por la acción de la estromelina en el sitio N341 -F342 del agrecano y un ensayo RIA que emplea un anticuerpo monoclonal específico para este neo-epítipo. Más generalmente, se describe el uso de anticuerpos monoespecíficos específicos para los fragmentos de agrecano, que se generan por la escisión de una estromelina específica. Las elevaciones de la estromelina se producen en la osteoartritis, la artritis reumatoide, las lesiones ateroscleróticas, la gota, la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), ciertos tipos de cáncer, las lesiones en las articulaciones, y numerosas enfermedades inflamatorias. Se indica que la estromelina es elevada en la fibrosis pulmonar idiopática,

y se alega que el ensayo puede realizarse en sangre u otros fluidos biológicos para detectar los productos de escisión de estromelina del agregado y que la cuantificación de dichos fragmentos se puede utilizar para el diagnóstico en relación con la FPI, así como en otras afecciones. Sin embargo, no se proporciona evidencia de esto y, según nuestro conocimiento, no ha habido publicaciones posteriores que validen esta predicción. Dichos ensayos de RIA han estado disponibles comercialmente durante muchos años y no han aparecido informes de su uso exitoso en el diagnóstico o seguimiento de ninguna enfermedad fibrótica.

La Patente de Estados Unidos 7.225.080 divulga un método para el diagnóstico de una enfermedad inflamatoria, fibrótica o cancerosa en un paciente midiendo los valores de al menos cuatro marcadores bioquímicos seleccionados del grupo que consiste en  $\alpha$ 2-macroglobulina, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (gamma-glutamilo transpeptidasa),  $\gamma$ -globulina, bilirrubina total, albúmina,  $\alpha$ 1-globulina,  $\alpha$ 2-globulina, haptoglobina,  $\beta$ -globulina, apoA1, IL-10, TGF- $\beta$ 1, apoA2 y apo en el suero o plasma de dicho paciente, y posteriormente combinando dichos valores para determinar la presencia de fibrosis hepática y/o lesiones necroinflamatorias hepáticas en dicho paciente. La patente no enseña la medición cuantitativa de fragmentos peptídicos portadores de neo-epítopos generados durante la enfermedad fibrótica.

La Patente de Estados Unidos 6.060.255 describe un método para diagnosticar el grado de fibrosis hepática, que comprende las etapas de medir la forma de alto peso molecular de colágeno de tipo IV en una muestra que utiliza un anticuerpo que se une específicamente al colágeno de tipo IV, y relacionar la medición con el grado de fibrosis hepática. De nuevo, no se hace uso de neo-epítopos producidos por enzimas proteolíticas que actúan en el cuerpo. La muestra en realidad se digiere con pepsina, lo que puede ocultar el patrón natural de escisión del colágeno en la muestra.

La Patente de Estados Unidos 4.628.027 (Gay) divulga la producción de anticuerpos específicos para proteínas de tejido conectivo y, más particularmente, la producción de anticuerpos monoclonales por híbridos de células fusionadas contra colágenos humanos y enzimas implicadas en la degradación del colágeno. Se describe el uso de anticuerpos monoclonales contra proteínas del tejido conectivo para establecer el perfil de colágeno de muestras de fluidos histológicos, citológicos y biológicos. Sin embargo, la patente no describe la medición de proteínas de tejido conectivo basándose en la unión de anticuerpos a neo-epítopos en dichas proteínas del tejido conectivo.

Guañabens N et al, J Bone Miner Res, 1998 <sup>98</sup> evaluaron los marcadores de renovación ósea N-telopéptido de colágeno de tipo I (NTX), C-telopéptido de colágeno de tipo I (CTX) y pro-péptido N-terminal de colágeno de tipo I (PINP) en pacientes con cirrosis biliar primaria, una enfermedad con un aumento de la fibrosis hepática. El nivel de NTX, CTX y PINP se elevó en los pacientes en comparación con los controles y se correlacionó con el estado histológico de la enfermedad. Los anticuerpos empleados en el NTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo N del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo YDGKGVG↓ SEQ ID NO 302. Los anticuerpos empleados en el CTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo C del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo EKAHDGGR↓ SEQ ID NO 303. Estos marcadores están localizados en telopéptidos del colágeno de tipo I y no en la parte interna (la triple hélice) del colágeno de tipo I. Los anticuerpos monoclonales empleados para el ensayo PINP se generaron contra un epítipo interno en la secuencia PINP que no es un neo-epítipo.

Møller S et al, Gut., 1999 <sup>99</sup> demostraron que el telopéptido reticulado C-terminal de colágeno de tipo I (ICTP) estaba elevado en pacientes con cirrosis alcohólica en comparación con los controles. El estudio descrito mostró que un marcador bioquímico puede reflejar fibrosis hepática. El anticuerpo policlonal ICTP se ha generado contra la tripsina y el colágeno escindido con colagenasa tipo I. Sin embargo, los anticuerpos no se unen a un neo-epítipo.

Rosen HN et al, Calcif Tissue Int, 2004 <sup>100</sup> evaluaron los marcadores de renovación ósea N-telopéptido de colágeno de tipo I (NTX) y C-telopéptido de colágeno de tipo I (CTX) en mujeres que recibieron tratamiento de reemplazo hormonal (TRH). En el estudio se observó que los marcadores de renovación ósea disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos empleados en el NTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo N del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo YDGKGVG↓ SEQ ID NO 302. Los anticuerpos empleados en el CTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo C del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo EKAHDGGR↓ SEQ ID NO 303. A diferencia de la presente invención, estos anticuerpos se usaron para evaluar el metabolismo óseo y no la fibrosis.

Lein M et al, Eur Urol, 2007 <sup>101</sup> evaluaron el uso de los marcadores de renovación ósea específicos de neo-epítipo N-telopéptido de colágeno de tipo I (NTX) y C-telopéptido de colágeno de tipo I (CTX) en pacientes con cáncer de próstata que recibieron ácido zoledrónico. En el estudio se observó que los marcadores de renovación ósea

disminuyeron con el tratamiento. Los anticuerpos empleados en el NTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo N del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo YDGKGVG↓ SEQ ID NO 302. Los anticuerpos empleados en el CTX se generaron contra un sitio de escisión de la catepsina K en el extremo C del colágeno de tipo I y dependen del neo-epítipo EKAHDGGR↓ SEQ ID NO 303. A diferencia de la presente invención, estos anticuerpos se utilizaron para evaluar el metabolismo óseo durante la invasión de metástasis óseas y no de fibrosis.

El PIIINP se ha utilizado en varios estudios para evaluar la gravedad de la enfermedad fibrótica<sup>102</sup>, en pacientes con fibrosis de la piel después de un traumatismo severo por quemaduras<sup>103</sup>, para la progresión de la enfermedad en la cirrosis biliar primaria no cirrótica<sup>104</sup>, en la cirrosis biliar primaria y la hepatitis viral crónica C<sup>105</sup>.

Se midieron PIIINP e ICTP en pacientes con fibrosis del miocardio<sup>106</sup>.

Muchos informes combinan un conjunto de marcadores bioquímicos para mejorar el valor predictivo del índice bioquímico. Se midieron once marcadores séricos diferentes en 205 pacientes con estadificación fibrótica de F0 a F4, y los marcadores más informativos fueron la macroglobulina alfa2, la globulina alfa2 (o haptoglobina), la globulina gamma, la apolipoproteína A1, la gamma glutamiltranspeptidasa y la bilirubina total<sup>107</sup>. Un índice de estos marcadores tuvieron un valor predictivo negativo (se obtuvo una certeza del 100% de la ausencia de F2, F3 o F4) para las puntuaciones que variaban de cero a 0,10 (12% [41] de todos los pacientes), y un alto valor predictivo positivo (>90% de certeza de presencia de F2, F3 o F4) para puntuaciones que variaban de 0,60 a 1,00 (34% [115] de todos los pacientes).

El documento WO2010/115749 describe numerosos neo-epítipos de algunas de las proteínas descritas anteriormente como biomarcadores de fibrosis y el documento WO2009/059972 describe numerosos neo-epítipos de algunas de las proteínas descritas anteriormente como biomarcadores de enfermedades cardiovasculares.

El documento US 2010/209940 describe métodos de diagnóstico o de cuantificación de fibrosis que comprenden la forma de realización de un inmunoensayo para medir los fragmentos de proteínas que contienen neo-epítipo presentes de forma natural en una muestra de biofluido, y la asociación de una elevación de dicha medida en dicho paciente por encima de un nivel normal con la presencia o extensión de la fibrosis.

Marian et al. ("Biomarkers of Cardiac Disease", Expert Rev. Mol. Diagn. 4(6), 805-520 (2004)) analiza biomarcadores seleccionados para la aterosclerosis coronaria, los síndromes coronarios agudos y la insuficiencia cardíaca.

Sin embargo, en ninguno de los informes mencionados anteriormente se sugiere que las mediciones de los fragmentos peptídicos basadas en los anticuerpos que se unen a neo-epítipos como se reivindica ahora podrían ser útiles para la evaluación de pacientes con enfermedad fibrótica o enfermedad inflamatoria.

La presente invención proporciona ahora un método de bioensayo que comprende realizar un inmunoensayo para medir los fragmentos de proteínas que contienen neo-epítipos presentes de forma natural en una muestra de biofluido de un paciente, en el que dicho inmunoensayo se realiza mediante un método que comprende: poner en contacto los fragmentos de proteínas presentes de forma natural en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica reactiva con un neo-epítipo formado por escisión de una proteína por una proteinasa y medir la extensión de la unión de fragmentos peptídicos a dicha pareja de unión inmunológica para medir en la misma fragmentos de proteína que comprenden dicho neo-epítipo, en el que dicha pareja de unión inmunológica es específicamente reactiva con la siguiente secuencia en el terminal N de un péptido: KTFGKM

Preferiblemente, la detección de la unión es cuantitativa.

El método puede incluir asociar una elevación de dicha medida en dicho paciente por encima de un nivel normal con la presencia de fibrosis o enfermedad inflamatoria. Preferiblemente, la cantidad de unión se compara con los valores de control establecidos para poblaciones de individuos sanos y de individuos **caracterizados por** una enfermedad fibrótica o por una afección inflamatoria.

Opcionalmente, un resultado elevado en un inmunoensayo de acuerdo con esta invención está asociado con fibrosis de la piel, fibrosis pulmonar o fibrosis hepática o enfermedad cardiovascular. Opcionalmente, un resultado elevado en un inmunoensayo de acuerdo con la invención puede estar asociado con una afección inflamatoria, tal como espondilitis anquilosante. El método puede comprender la etapa preliminar de obtener una muestra de biofluido del paciente.

Dicha pareja de unión inmunológica tiene afinidad de unión específica por fragmentos peptídicos que comprenden el neo-epítipo N-terminal.

- 5 La reactividad específica con o afinidad inmunológica para un neo-epítipo implicará que la pareja de unión inmunológica relevante no es reactiva con la proteína intacta de la que deriva el neo-epítipo. Preferiblemente, dicha pareja de unión inmunológica no es reactiva con una secuencia de neo-epítipo si la secuencia se prolonga más allá del sitio de escisión respectivo. Esto implicará que los péptidos medidos terminan con la secuencia designada.
- 10 El término "pareja de unión inmunológica" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y también fragmentos de unión específicos de anticuerpos tales como Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Por lo tanto, dicha pareja de unión inmunológica puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión específica.
- 15 Preferiblemente, la secuencia de neo-epítipo a la que se une la pareja de unión inmunológica no se encuentra en ninguna otra proteína o no se encuentra en ninguna de las otras proteínas a las que se refiere el método de la invención.

- El resultado de un ensayo de acuerdo con la invención se puede combinar con uno o más biomarcadores medidos para formar un índice compuesto de valor diagnóstico o pronóstico.

- En general, todos los formatos de inmunoensayo conocidos previamente se pueden usar de acuerdo con esta invención, incluyendo formatos heterogéneos y homogéneos, ensayos en sándwich, ensayos de competición, ensayos ligados a enzimas, ensayos radioinmunes y similares. Por lo tanto, opcionalmente, dicho método se realiza como un inmunoensayo de competición en el que dicha pareja de unión inmunológica y un agente de competición se incuban en presencia de dicha muestra y el agente de competición compete con los fragmentos peptídicos en la muestra para unirse a la pareja de unión inmunológica.

- Dicho agente de competición puede ser (1) un péptido sintético derivado de la secuencia de versicano o un agente de competición derivado de (2) una proteína nativa purificada nombrada anteriormente escindida por proteasas para revelar dicho neo-epítipo.

- Un método adecuado podría ser un inmunoensayo de competición usando anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a anticuerpos que se unen a neo-epítipos de una proteína nombrada anteriormente. Los péptidos sintéticos seleccionados apropiadamente recubiertos sobre la superficie sólida de una placa de microtitulación podrían competir con la muestra para unirse a los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión. Como alternativa, podrían usarse fragmentos de proteína nativa purificada que llevan el neo-epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión en la superficie sólida. Otra alternativa más es inmovilizar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión en la superficie sólida y luego co-incubar la muestra con un péptido sintético ligando adecuadamente a una molécula señal, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o biotina.

La muestra puede ser una muestra de suero, sangre o plasma u otro tipo, por ejemplo, biopsia de tejido fibrótico.

- Los ensayos pueden realizarse como ensayos en sándwich usando una primera pareja de unión inmunológica específicamente reactiva con dicho neo-epítipo y una segunda pareja de unión inmunológica reactiva con la proteína relevante a la que pertenece el neo-epítipo. Opcionalmente, dicha segunda pareja de unión inmunológica se dirige a un segundo neo-epítipo de la misma proteína.

- El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen neo-epítipos específicos es como se indica a continuación. Esto se puede lograr inmunizando ratones con péptidos sintéticos que se originan a partir de la secuencia de aminoácidos de las moléculas de una proteína nombrada (incluidas las secuencias enumeradas anteriormente o las secuencias que terminan en la misma), fusionando las células esplénicas de ratones seleccionados a células de mieloma, y ensayando los anticuerpos monoclonales para determinar la unión a neo-epítipos en péptidos sintéticos relevantes. La especificidad para los neo-epítipos se puede asegurar al requerir reactividad con un péptido sintético y una falta de reactividad con una forma C prolongada del péptido de inmunización (para un neo-epítipo C-terminal) o una forma N-terminal prolongada del péptido de inmunización (para un neo-epítipo N-terminal). Los anticuerpos para los neo-epítipos también se pueden evaluar para establecer una falta de capacidad de unión a la proteína nativa. Como alternativa, la especificidad para un neo-epítipo puede garantizarse exigiendo que la reactividad del anticuerpo sea dependiente de forma negativa de la presencia de

biotina u otros grupos funcionales unidos covalentemente a uno de los aminoácidos terminales.

A continuación, se describen kits que pueden usarse convenientemente para realizar los métodos descritos anteriormente. Dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con péptido sintético; (2) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a anticuerpo reactivo con dicho péptido sintético; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Como alternativa, dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con fragmentos de proteínas nativas purificadas; (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo en los fragmentos relevantes y reactivo con dichos fragmentos de proteínas purificadas; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Como alternativa, dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético unido a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo en fragmentos de proteínas y reactivo con dicho péptido sintético; y (4) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Aún otra alternativa podrían ser los kits que incluyen (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético unido a biotina; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neo-epítipo en fragmentos de proteínas relevantes (y reactivo con dicho péptido sintético) y conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Los ensayos descritos en el presente documento son útiles en el diagnóstico de fibrosis o afecciones inflamatorias en pacientes. Además, las pruebas son útiles para la evaluación de la progresión de la enfermedad y el seguimiento de la respuesta a la terapia. Los socios de unión inmunológica descritos en el presente documento también se pueden usar en la inmunotinción para mostrar la presencia o ubicación de los productos de escisión de proteínas descritos.

La Figura 1 en los paneles A y B muestra los resultados de la investigación de la especificidad de un anticuerpo monoclonal;  
la Figura 2 muestra los resultados de la investigación de la cantidad de fragmentos que tienen neo-epítipo de colágeno V en suero humano de pacientes con espondilitis anquilosante.  
La Figura 3 muestra una curva estándar obtenida en el Ejemplo 5;  
la Figura 4 muestra la liberación de péptidos medida a partir de cultivos *ex vivo* en el Ejemplo 5;  
la Figura 5 muestra mediciones de péptidos adicionales obtenidas en el Ejemplo 5;  
la Figura 6 muestra en los paneles (a) a (d) medidas adicionales obtenidas en el Ejemplo 5;  
la Figura 7 muestra mediciones de péptidos adicionales en suero obtenidas en el Ejemplo 5;  
la Figura 8 muestra el péptido en suero medido en el Ejemplo 6;  
la Figura 9 muestra un ensayo de especificidad de anticuerpos descrito en el Ejemplo 7;  
la Figura 10 muestra los niveles plasmáticos de péptido medidos en el Ejemplo 7;  
la Figura 11 muestra las curvas ROC obtenidas en el Ejemplo 7;  
la Figura 12 muestra los resultados de ELISA obtenidos en el Ejemplo 8;  
la Figura 13 muestra mediciones de péptidos relacionadas con la espondilitis anquilosante obtenidas en el Ejemplo 8; y  
la Figura 14 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 9.

#### **Ejemplo 1: Identificación de fragmentos de colágeno de tipo V por escisión enzimática**

##### ***Reactivos***

Todos los reactivos utilizados para los experimentos fueron productos químicos estándar de alta calidad de empresas tales como Merck (Whitehouse Station, NJ, EE. UU.) y Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Los péptidos sintéticos utilizados para la producción de anticuerpos monoclonales se adquirieron en la Chinese Peptide Company, Beijing, China.

##### ***Escisión in vitro***

El colágeno de tipo V purificado de placenta humana (cat. n.º ab7537, Abcam, Cambridge, Reino Unido) se escindió con pro-MMP-2 o pro-MMP-9 (cat. n.º 444213; 444231; Calbiochem, Merck, Whitehouse Station, NJ, EE.UU.). Se activaron cincuenta µg de MMP-2 o MMP-9 con 20 µl de acetato de 4-aminofenilmercúrico 1 mM (APMA) en dimetilsulfóxido y se incubaron a 37°C durante 3 horas. El colágeno de tipo V se administró disuelto en ácido acético 0,5 M. Para facilitar la escisión de MMP, la proteína se dializó durante dos días para eliminar el ácido acético. El líquido se filtró para eliminar proteínas por debajo de 10 kDa (Microcon Ultracel YM-10, cat. n.º 42407, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Cada escisión de MMP se realizó por separado mezclando 100 µg de colágeno de tipo V y 1 µg de MMP-2 o MMP-9 en tampón de MMP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, acetato de Zn 2 mM, pH

8,0). Como control, se mezclaron 100 µg de colágeno con tampón de MMP solo. Las soluciones se incubaron durante 2 horas a 37°C. La reacción de escisión se detuvo utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 µM hasta una concentración final de 1 µM. La escisión se verificó mediante visualización utilizando el kit de tinción de plata SilverXpress® (cat. n.º LC6100, Invitrogen, Carlsbad, Ca, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Identificación de péptidos

Los fragmentos de péptidos en las muestras escindidas *in vitro* se identificaron usando cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas en tándem de ionización por electronebulización (ESI) (LC-MS/MS). Las muestras de LC-MS se ultrafiltraron para eliminar las proteínas por encima de 10 kDa, el pH se ajustó a 2,0 usando ácido fórmico, y se analizó una muestra de 4 µl por LC-MS/MS. El análisis por LC se realizó en una columna nanoACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, EE.UU.) utilizando un gradiente de ácido fórmico/acetonitrilo. Los análisis por MS y MS/MS se realizaron en una MS de tiempo de vuelo de tiempo cuádruple de espectrometría de masas de alta definición Synapt (QUAD-TOF; Waters, Milford, MA, EE.UU.), con un rango de adquisición de 350-1600 m/z en MS y 50-2000 m/z, en MS/MS. El software "ProteinLynx Global SERVER (PLGS)" (Waters, Milford, MA, EE. UU.) se utilizó para analizar espectros y generar listas de picos. Para identificar los péptidos, se realizaron búsquedas de datos de MS y MS/MS en una base de datos de proteínas de colágeno de tipo V (FASTA) utilizando el software Mascot 2.2 (Matrix Science, Boston, MA, EE. UU.) con las configuraciones ESI-QUAD-TOF y carbamidometilo (C), oxidación de metionina (M), oxidación de lisina (K) y oxidación de prolina (P) como modificaciones variables.

Los seis aminoácidos en el extremo N o C de los péptidos identificados por MS se consideraron como un neo-epítipo generado por la proteasa en cuestión. Todas las secuencias generadas por la proteasa se analizaron para determinar la homología y la distancia a otros sitios de escisión y se analizaron para determinar la homología utilizando NPS@: análisis de secuencia de proteínas de red (Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@:network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci 2000; 25: 147-50).

### Ejemplo 2: Desarrollo de un ensayo ELISA para fragmentos identificados

#### Conjugación de péptidos

La conjugación de péptidos se realizó utilizando el kit de conjugación de inmunógeno activado con maleidida (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). Brevemente, el neo-epítipo inmunogénico que contenía cisteína (HMGREGREGE-GGC, 400 µl de péptido a 5 mg/ml) con un grupo sulfhidrilo libre (-SH) se mezcló en un tampón de conjugación con la ovalbúmina activada con maleimida (OVA) (180 µl de OVA a 10 mg/ml) como una proteína transportadora con un grupo maleimida disponible que podría reaccionar con péptidos que contenían sulfhidrilo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los productos conjugados se eliminaron de EDTA y azida de sodio mediante desalinización o diálisis durante dos días. Para los péptidos conjugados con biotina, la lisina conjugada con biotina se añadió en el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida.

#### Desarrollo de anticuerpos monoclonales

Se inmunizaron por vía subcutánea ratones Balb/C de 4 a 6 semanas de edad con aproximadamente 200 µl de antígeno emulsionado y 50 µg del neo-epítipo CO5-MMP (HMGREGREGE-GGC-OVA). Se realizaron inmunizaciones consecutivas a intervalos de 2 semanas hasta que se alcanzaron niveles estables de títulos séricos en el adyuvante incompleto de Freund. Se recogieron muestras de sangre de la 2ª inmunización. En cada muestra de sangre, se determinó el título sérico y se seleccionó el ratón con el título anti-suero más alto para la fusión. Después de la 4ª inmunización, este ratón descansó durante 1 mes y luego se reforzó por vía intravenosa con 50 µg de CO5-MMP en 100 µl de una solución de cloruro de sodio al 0,9% tres días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

#### Fusión y cribado de anticuerpos

El procedimiento de fusión se realizó de acuerdo con lo descrito por Geffer et al<sup>132</sup>. Brevemente, las células de bazo de ratón se fusionaron con células asociadas a la fusión de mieloma SP2/0. Las células de hibridoma se clonaron utilizando un método de medio semisólido y se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos para un crecimiento adicional y se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Se utilizó una dilución limitada estándar para promover el crecimiento monoclonal. Los sobrenadantes se cribaron utilizando un ELISA indirecto con placas de

microtitulación recubiertas con estreptavidina y HMGREGREGE-K-Biotina como un péptido de captura.

### **Caracterización de clones**

- 5 La reactividad nativa y la unión peptídica de los anticuerpos monoclonales se evaluaron mediante el desplazamiento de muestras nativas (suero, plasma y orina procedentes de ser humano/rata/ratón) en un ELISA preliminar utilizando 10 ng/ml de recubrimiento de péptidos biotinilados en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina y el sobrenadante del hibridoma monoclonal en crecimiento. Las especificidades de los clones con respecto a un péptido libre (HMGREGREGE), un péptido sin sentido, y un péptido alargado (GHMGREGREG) se ensayaron. La
- 10 isotipificación de los anticuerpos monoclonales se realizó con el kit Clonotyping System-HRP kit, cat. n.º 5300-05 (Southern Biotech, Birmingham, AL, EE.UU.). Los clones seleccionados se purificaron utilizando columnas de proteína G de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales seleccionados se marcaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizando el kit de etiquetado de HRP Lightning link de acuerdo con las instrucciones del
- 15 fabricante (Innovabioscience, Babraham, Cambridge, Reino Unido).

### **Metodología ELISA CO5-MMP**

- En experimentos preliminares, se optimizaron los reactivos, sus concentraciones y los periodos de incubación realizando varios análisis de tablero de ajedrez. La ELISA CO5-MMP se desarrolló de la siguiente manera: Una
- 20 placa de estreptavidina de 96 pocillos se recubrió con 5 ng/ml de péptido sintético biotinilado HMGREGREGE-K-Biotina disuelta en tampón de ensayo (Tris 25 mM, BSA al 1%, Tween-20 al 1%, pH 7,4) y se incubaron 30 minutos a 20°C agitando constantemente a 300 rpm. Se añadieron veinte µl de calibrador de péptidos o muestra disuelta en el tampón de ensayo a los pocillos apropiados, seguido de 100 µl de anticuerpo monoclonal conjugado (125 ng/ml) y
- 25 se incubaron durante 1 hora a 4°C con agitación constante a 300 rpm. Finalmente, se añadieron 100 µl de tetrametilbencinidina (TMB) (Kem-En-Tec cat. n.º 438OH) y la placa se incubó durante 15 minutos a 20°C en la oscuridad y se agitó a 300 rpm. Después de cada etapa de incubación, la placa se lavó cinco veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). La reacción de TMB se detuvo añadiendo 100 µl de solución de parada (HCl al 1%) y se midió espectrofotométricamente a 450 nm con 650 nm como referencia. Se realizó una curva
- 30 estándar mediante dilución en serie del péptido CO5-MMP (HMGREGREGE) y se representó mediante un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros. Las concentraciones estándar fueron 0, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 ng/ml.

### **Evaluación técnica**

- 35 A partir de diluciones de 2 veces de muestras de suero agrupadas, se calculó la linealidad como un porcentaje de recuperación de la muestra al 100%. El límite de detección inferior (LDL) se calculó a partir de 21 determinaciones del estándar más bajo (el estándar cero) y se calculó como la media + 3x desviación estándar. La variación inter e intraensayo se determinó mediante 10 ejecuciones independientes de 5 muestras de QC, y cada ejecución consistió
- 40 en dos réplicas de determinaciones dobles de las muestras. Finalmente, para cada ensayo, se utilizó un calibrador maestro preparado a partir de péptidos sintéticos cuantificados con precisión mediante análisis de aminoácidos para fines de calibración.

- La estabilidad del analito se determinó para tres muestras de suero humano para 10 ciclos de congelación y
- 45 descongelación.

### **Ejemplo 3: Caracterización ELISA**

- El ELISA de CO5-MMP desarrollado se evaluó utilizando 20 µl de las muestras: colágeno de tipo V intacto, colágeno
- 50 de tipo V escindido con MMP-2, colágeno de tipo V escindido con MMP-9, colágeno de tipo V escindido con MMP-13, y una secuencia de aminoácidos de CO5-MMP alargada (GHMGREGREG). La reactividad cruzada se ensayó utilizando colágeno de tipo I escindido *in vitro*.

- Los resultados se muestran en la Figura 1, paneles A y B, que muestran el porcentaje de inhibición de la señal de:
- 55 A) Péptido libre (HMGREGREGE), colágeno de tipo V intacto, colágeno de tipo V escindido por MMP-9, colágeno de tipo V escindido por MMP-2; B) Péptido libre (HMGREGREGE), colágeno de tipo V escindido por MMP-13, colágeno de tipo I escindido por MMP-9, péptido alargado (GHMGREGREG). Se puede ver en el panel A que el anticuerpo no es sustancialmente reactivo con el colágeno intacto tipo V, sino que es reactivo con el colágeno de tipo V escindido, y en el panel B que el anticuerpo no es reactivo con el péptido extendido N-terminal. Por lo tanto, se demuestra que

el anticuerpo es específicamente reactivo con el neo-epítipo N-terminal producido por la escisión enzimática.

#### **Ejemplo 4: Utilidad clínica**

##### **5 Sujetos sanos y pacientes con AS**

Los marcadores bioquímicos se evaluaron en suero de pacientes diagnosticados con espondilitis anquilosante (AS, de acuerdo con los criterios de Nueva York modificados) y se compararon con muestras de suero sin enfermedad del mismo sexo y edad del Department of Medicine 3 de la University of Erlangen-Nuremberg. El grupo sin enfermedad consistió en 21 mujeres sanas y 19 hombres sanos con una edad media de 43,0 años, rango de 18 a 66. El grupo de AS consistió en 19 mujeres y 21 hombres con una edad media de 42,5 años, rango 29 a 63 años.

#### **Estadística**

Los niveles séricos de CO5-MMP entre los dos grupos se midieron utilizando el ELISA (los resultados se muestran en la Figura 2) y se compararon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos caras. En la Figura 2, las barras indican niveles medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El área bajo la curva se midió en ROC. Las relaciones de probabilidades se extrapolaron de la tabla de contingencia en la que todos los sujetos se clasificaron como con niveles bajos (dentro de 2 DE de la media de la población normal) o altos ( $>2$  DE) del biomarcador. Los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0,05$ .

Estos resultados sugieren fuertemente que el neo-epítipo medido de colágeno de tipo V es un marcador valioso para AS.

##### **25 Ejemplo 5 Ensayo de biglicano NB202: BGM .YWEVQPATFR SEQ ID NO 113**

Aquí se demuestra el desarrollo de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la medición de un neo-epítipo de BGN generado por MMP-9, MMP-12 y MMP-13 y se prueba la validez biológica del ensayo en dos modelos de rata de fibrosis hepática. **Métodos:** El BGN se escindió *in vitro* por MMP-9, -12 y -13 y el péptido  $\square^{344}$ YWEVQPATFR $\square^{353}$  (BGN-344) se eligió como un neo-epítipo potencial. Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra el péptido seleccionado en el desarrollo de un ELISA competitivo, que medía el neo-epítipo de BGN degradado por MMP. El ensayo se validó en dos modelos de rata de fibrosis hepática, el modelo de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCL<sub>4</sub>), y el modelo de ligadura del conducto biliar (BDL).

**Resultados:** Se encontró un aumento significativo en BGN-344 en suero en ratas tratadas con CCL<sub>4</sub> durante 16 semanas (200 ng/ml frente a 120 ng/ml,  $p = 0,0013$ ) y 20 semanas (190 ng/ml frente a 100 ng/ml,  $p = 0,019$ ) en comparación con los grupos de control, así como en todos los grupos de ratas sometidas a BDL en comparación con los grupos operados de forma simulada. Además, hubo una correlación significativa de los niveles séricos de BGN-344 con la extensión de la fibrosis hepática determinada por la tinción con rojo Sirius de las secciones hepáticas en el modelo CCL<sub>4</sub>.

**Conclusión:** Se demostró que el producto de remodelación tisular patológico específico de BGN degradados por MMP, concretamente, el neo-epítipo BGN-344, aumenta durante la fibrosis hepática en un modelo CCL<sub>4</sub> y en un modelo BDL tanto a nivel *in vivo* como *ex vivo*.

#### **Desarrollo de ensayos:**

El desarrollo del ensayo de los anticuerpos monoclonales seleccionados obtenidos de la fusión incluyó las siguientes pruebas generales, de acuerdo con las SOP (datos no mostrados): 1) Tablero de ajedrez (es decir, afinidad de unión a antígeno-antígeno) - concentraciones de anticuerpo frente a revestimiento en diferente tiempo de incubación, temperatura de incubación y tampón de incubación; 2) Desplazamiento (es decir, resistencia competitiva), para evaluar la especificidad del anticuerpo y la sensibilidad a un péptido estándar, péptido sin sentido, suero humano, BGN nativo, BGN nativo procesado *in vitro* con MMP-9, MMP-12 y MMP-13; 3) Afinidad de etiquetado a la peroxidasa, evaluada utilizando el kit de etiquetado de peroxidasa de rábano picante Lightning-Link™ (Innova Bioscience Ltd, Babraham, Reino Unido). Basándose en los resultados de estas pruebas, se seleccionó el anticuerpo monoclonal NB202-7-5A1 para el desarrollo final del ensayo.

El procedimiento ELISA competitivo de BGN-344 se desarrolló de la siguiente manera: se recubrió una placa recubierta con estreptavidina de 96 pocillos con 1,25 ng/ml de YWEVQPATFR-K-Biotina (SEQ ID NO 305) durante

30 min, a 20°C, a 300 rpm. Los pocillos se lavaron entonces 5 veces con tampón de lavado estándar. Se preparó una fila estándar mediante una dilución previa doble del péptido estándar (YWVQPATFR) en Tris-BTB 50 mM a partir de 250 ng/ml. Las muestras (es decir, suero humano, suero de ratón, suero de rata) también se diluyeron. Se añadieron estándares y muestras [20 µl/pocillo], seguido de la adición de 100 µl/pocillo de 20 ng/ml de anticuerpo NB202-7-5A1 marcado con peroxidasa en tampón Tris BTB 50 mM. Las placas se incubaron durante 1 hora a 4°C a 300 rpm. Después del periodo de incubación, los pocillos se lavaron 5 veces y se incubaron con 100 µl de TMB a 4°C, 300 rpm, durante 15 minutos, seguido de la adición de 100 µl de solución de parada en cada pocillo. La reacción colorimétrica se midió a 450 nm con referencia a 650 nm en un lector de placas de laboratorio estándar. Los datos se adquirieron con el programa SoftMax Pro v5.0.

10

#### **Modelo de rata de fibrosis hepática inducida por CCL<sub>4</sub>:**

Los niveles de BGN-344 se midieron en un modelo de rata de inhalación de CCL<sub>4</sub> de fibrosis hepática. Los detalles completos del estudio se describen en otra parte (133). El estudio incluyó 52 ratas Wistar macho tratadas con CCL<sub>4</sub> y 28 ratas Wistar de control (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, Francia). La inducción de fibrosis hepática se realizó como se ha descrito previamente (134). En resumen, se administró CCL<sub>4</sub> por inhalación dos veces por semana y se añadió fenobarbital (0,3 g/l) al agua de beber. Las ratas de control recibieron fenobarbital solamente. Los animales se estratificaron en grupos que recibieron 8, 12, 16 o 20 semanas de CCL<sub>4</sub> o tratamiento de control (n = 13 para CCL<sub>4</sub>; n = 7 de control para cada grupo). El estudio se realizó después del consentimiento informado por escrito específicamente aprobado por el Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic Universitari (Barcelona, España), aprobación N.º B-NNP-233/09. Cuatro animales de los grupos de CCL<sub>4</sub> murieron durante el estudio. La sangre se recogió al finalizar y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la coagulación, antes de la centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -80°C antes de la evaluación del biomarcador. Las secciones de hígado (4 µm de espesor) se tiñeron en rojo Sirius F3B al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en ácido pícrico saturado (Sigma-Aldrich). De cada animal analizado, la cantidad de fibrosis se expresó como un porcentaje del área total del hígado de 36 campos y el valor promedio presentado (135).

#### **Modelo de rata de fibrosis hepática inducida por la ligadura de las vías biliares (BDL):**

30

Los niveles de BGN-344 se midieron en un modelo de rata de fibrosis hepática inducida por la ligadura del conducto biliar. Los detalles completos del estudio se describen en otra parte (133, 136). El estudio incluyó un total de 81 ratas Sprague-Dawley hembra de 6 meses. La fibrosis hepática se indujo en ratas anestesiadas por BDL estándar en la que el conducto biliar se ligó en dos lugares y se diseccionó entre las ligaduras antes de cerrar el abdomen. En ratas operadas de forma simulada, el abdomen se cerró sin BDL.

Las ratas se dividieron en cuatro grupos: el grupo 1 (10 BDL, 8 simulaciones) se sacrificó después de una semana, el grupo 2 (12 BDL, 8 simulaciones) se sacrificó después de dos semanas, el grupo 3 (13 BDL, 8 simulaciones) se sacrificó después de tres semanas, y el grupo 4 (14 BDL, 8 simulaciones) se sacrificó después de cuatro semanas.

40

La Figura 3 muestra a) Ejemplo de la curva estándar en una configuración ELISA competitiva b) Medición del péptido BGN-344 para biglicano degradado por MMP-9, MMP-12 y MMP-13 *in vitro* (BGN/MMP9, BGN/MMP12 y BGN/MMP13) y para biglicano intacto (BGN).

La Figura 4 muestra la liberación del péptido BGN-344 a partir de cultivos *ex vivo* de explantes bovinos (BEX), medidos los días 3 y 17 del cultivo en cinco repeticiones. w/o = cultivos sin ninguna estimulación; MI = cultivos metabólicamente inactivos por el tratamiento con nitrógeno líquido; T + O = estimulación de citocinas catabólicas con TNFα [20 ng/ml] y oncostatina [10 ng/ml]; T+O+GM6001 = citocinas catabólicas con TNF α [20 ng/ml] y oncostatina [10 ng/ml] complementadas con inhibidor de MMP selectivo GM6001; T+O+E64 = citocinas catabólicas con TNF α [20 ng/ml] y oncostatina [10 ng/ml] complementadas con inhibidor selectivo de la cisteína proteasa E64 (\*\*\*) = p < 0,001).

La Figura 5 muestra los valores absolutos de la cuantificación de rojo Sirius en ratas tratadas con CCL<sub>4</sub> determinados a las 8, 12, 16 y 20 semanas de tratamiento. (Animales tratados con CCL<sub>4</sub>: n = 13; controles: n = 7 para cada grupo).

La Figura 6 muestra a) los niveles séricos en la circulación medios de BGN-344 en el modelo de rata inducido con tetracloruro de carbono (CCL<sub>4</sub>) de fibrosis hepática medidos a las 8, 12, 16 y 20 semanas (animales tratados con CCL<sub>4</sub>: n = 13; controles: n = 7 para cada grupo). b) Niveles séricos de BGN-344 en todas las ratas control y todas

las ratas CCL<4< estratificadas en cuartiles de acuerdo con el contenido total de colágeno en el hígado determinado por rojo Sirius; (ns = no significativo, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Correlación del BGN-344 sérico en la circulación y la cuantificación histológica de rojo Sirius que determina la extensión de la fibrosis hepática en c) ratas tratadas con CCL<4< y d) controles.

5

La Figura 7 muestra los niveles séricos medios de BGN-344 en la circulación en ratas operadas de BDL y de forma simulada al inicio y al final de las semanas 1, 2, 3, 4. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

#### 10 **Ejemplo 6: Ensayo de colágeno de tipo I NB91 (generado por FAP): Protocolo de ensayo de CO1-462 AGKEGPVGLP (SEQ ID NO 49)**

Se marcó un anticuerpo monoclonal seleccionado con peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizando el kit de etiquetado de HRP Lightning link de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Innovabioscience, Babraham, Cambridge, Reino Unido). Se recubrió una placa de estreptavidina de 96 pocillos con péptido sintético biotinilado AGKEGPVGLP-Biotina disuelto en tampón de ensayo (Tris 50 mM, BSA al 1%, Tween-20 al 0,1%, pH 7,4 ajustado a 20°C) y se incubó durante 30 minutos a 20°C. Se añadieron 20  $\mu$ l de calibrador de péptido o muestra a los pocillos apropiados, seguido de 100  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal conjugado 3H2-HRP y se incubaron durante 1 hora a 20°C. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ l de tetrametilbencinidina (TMB) (Kem-En-Tec cat. 438OH) y la placa se incubó durante 15 minutos a 20°C en la oscuridad. Todas las etapas de incubación anteriores incluían agitación a 300 rpm. Después de cada etapa de incubación, la placa se lavó cinco veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). La reacción de TMB se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de solución de parada (HCl al 1%) y se midió a 450 nm con 650 nm como referencia. Se trazó una curva de calibración utilizando un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros.

25

#### **Modelo de fibrosis hepática de ligadura del conducto biliar de rata:**

CO1-462 se evaluó en un modelo de rata de BDL de fibrosis hepática. La junta danesa de bienestar animal "Dyreforsøgstilsynet" en Copenhague, Dinamarca, aprobó y dio un consentimiento informado por escrito del estudio; aprobación n.º 2008/561-1450. El estudio se ha descrito en detalle en otra parte (Veidal et al. 2010b). Brevemente, 17 ratas Sprague-Dawley hembra de 6 meses de edad se estratificaron en 4 grupos: Se sacrificaron ratas operadas por BDL o de forma simulada después de 2 o 4 semanas. La fibrosis hepática se indujo en ratas anestesiadas por BDL estándar en la que el conducto biliar se ligó en dos lugares y se diseccionó entre las dos ligaduras antes de cerrar el abdomen. En ratas operadas de forma simulada, el abdomen se cerró sin cirugía BDL. Las muestras de sangre se tomaron bajo anestesia con CO<2</O<2< al inicio del estudio y al final del seno retro-orbital de ratas que habían ayunado durante al menos las 14 horas anteriores. La sangre recogida se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente hasta coagularse seguido de centrifugación 2x a 1500g durante 10 minutos. El suero se transfirió entonces a tubos limpios y se almacenó a -80°C hasta su uso. La validez del modelo BDL se demostró por (137).

40

Los resultados se muestran en la Figura 8. Se observó una elevación significativa de la señal medida después de dos semanas.

#### **Ejemplo 7 Ensayo de versicano NB158: VCAN 3306 (.KTFGKMKPRY)**

45

La remodelación de la matriz extracelular es una característica clave en el desarrollo de la lesión aterosclerótica y un requisito previo para la ruptura de las placas. El proteoglicano versicano se encuentra en placas ateroscleróticas y es un sustrato potencial para las MMP presentes en áreas ricas en macrófagos. Se ha desarrollado un inmunoensayo para detectar un fragmento de degradación de versicano derivado de MMP12 específico (VCAN-3306) y evaluar su potencial como biomarcador para el diagnóstico de aterosclerosis.

50

**Métodos y resultados:** Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra VCAN-3306 para el desarrollo de un ELISA competitivo. Se utilizaron muestras de plasma clínicas de pacientes con diferentes grados de aterosclerosis para la validación del ensayo. El VCAN-3306 en las arterias coronarias de cinco adultos fallecidos se detectó utilizando el VCAN-3306 mAb. Las arterias con la carga de placa más baja mostraron muy poca o ninguna reactividad, en comparación con las arterias afectadas por placas ateroscleróticas intermedias y grandes, que mostraron una alta reactividad hacia VCAN-3306 mAb. Los pacientes que experimentaron I) síndrome coronario agudo (n = 30), II) cardiopatía isquémica estable (n = 30) y III) que demostraron niveles altos de depósitos coronarios de calcio (n = 30) tenían niveles plasmáticos significativamente más altos de VCAN-3306 en comparación

55

con un grupo de control de individuos (n = 30) sin depósitos coronarios de calcio detectables. Además, se demostró una fuerte asociación entre la presencia de VCAN-3306 y LDL y el colesterol total en pacientes con altos niveles de depósitos coronarios de calcio.

- 5 **Conclusiones:** Los neo-epítomos de versicano generados por MMP12 están presentes en las placas ateroscleróticas humanas. La degradación de versicano mediada por MMP12 fue significativamente elevada en pacientes con enfermedades ateroscleróticas, lo que sugiere que el VCAN-3306 es un biomarcador potencial para la aterosclerosis.

#### 10 **Protocolo de ensayo de VCAN-3306:**

Los anticuerpos monoclonales seleccionados se marcaron con peroxidasa de rábano picante (HRP) usando el kit de etiquetado de anticuerpo de peroxidasa de rábano picante (HRP) Lightning-Link de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Innova Bioscience, Babraham, Cambridge, Reino Unido). Una placa pre-recubierta de estreptavidina de 15 96 pocillos adquirida en Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) se recubrió con 2,5 ng del péptido sintético biotinilado, KTFGKMKPRY-K-Biotina (SEQ ID NO 306), se disolvió en tampón de ensayo 50 mM PBS BTB y se incubó durante 30 minutos a 20°C. Se añadieron 20 µl del calibrador de péptidos o muestra a los pocillos apropiados, seguido de 100 µl de 20 ng/ml de anticuerpo monoclonal conjugado, y se incubaron durante 1 hora a 20°C. Finalmente, se añadieron 100 µl de tetrametil bencinidina (TMB) (Kem-En-Tec cat. 438OH, Taastrup, 20 Dinamarca), y la placa se incubó durante 15 minutos a 20°C en la oscuridad. Todas las etapas de incubación anteriores incluían agitación a 300 rpm. Después de cada etapa de incubación, la placa se lavó cinco veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). La reacción de TMB se detuvo añadiendo 100 µl de solución de parada (HCl al 1%) y se midió a 450 nm con 650 nm como referencia. Se trazó una curva de calibración estándar utilizando un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros con una concentración inicial de 10 ng para el péptido 25 estándar después de una dilución doble y el último estándar fue un estándar cero.

#### **Muestras y procedimientos para inmunohistoquímica:**

Especímenes: Se obtuvieron arterias coronarias de pacientes mayores de 25 años que murieron durante un periodo 30 de 18 meses en el North Carolina Baptist Hospital, Winston-Salem, EE.UU., como se ha descrito previamente (138).

Procedimientos histopatológicos: Cinco corazones obtenidos en autopsia se lavaron con una solución salina normal y se fijaron por perfusión con una solución de formaldehído tamponada neutra al 4% a una presión de 100 mm Hg durante 1 hora. Se cortaron bloques de tejido adyacentes para el corte histológico (cada uno de 3 mm de largo) 35 perpendiculares al eje largo (proximal 3 cm) de la descendente anterior izquierda (LAD), la circunfleja izquierda, y las arterias coronarias derechas. Se hicieron dos secciones histológicas de 5 µm de cada bloque. Una se tiñó con hematoxilina-eosina y la otra con tinción de Verhoeff-van Gieson.

El protocolo estándar de Nordic Bioscience se usó para la tinción de VCAN-3306 de arterias coronarias 40 descendentes anteriores izquierdas humanas de los cinco individuos, cada uno con un grado diferente de aterosclerosis. Brevemente, las arterias incluidas en parafina se cortaron en secciones de 5 µm, se desparafinizaron, y la peroxidasa se bloqueó y se rehidrató. Las secciones se sometieron a pretratamiento 2 x 5 min en un microondas a 800 W. En lo sucesivo, las secciones se lavaron en TBC + Triton X-100 al 1%, se bloquearon en caseína al 0,5% en TBS y se incubaron con 2,25 µg/ml de mA b contra VCAN-3306 diluido en tampón de TBS durante una noche a 45 4°C. Las secciones se lavaron posteriormente en TBS + Triton X-100 al 1%, se incubaron en Super Sensitive durante 30 minutos, se lavaron de nuevo y se trataron con sustrato DAB (6-10 minutos). Las secciones se sumergieron en hematoxilina Mayers durante 12 segundos, se montaron y se dejaron secar.

#### **Pacientes y recogida de muestras:**

50 Se seleccionaron cuatro grupos de 30 individuos cada uno, con diferentes grados de enfermedad cardíaca aterosclerótica, de tres estudios grandes (DANRISK, DEFAMI y Odense Artery Biobank). Los participantes en estos estudios se incluyeron simultáneamente por el Odense University Hospital, Odense, Dinamarca. Los cuatro grupos consistían en: 1) 30 individuos asintomáticos sin calcio coronario detectable (CT-noCa), 2) 30 sujetos asintomáticos 55 con CVD subclínica definida por la presencia de calcio coronario (CT-plusCa), 3) 30 pacientes con enfermedad cardíaca isquémica estable (IHD), destinada a cirugía de derivación coronaria, y 4) 30 pacientes con síndrome coronario agudo (ACS) y aparición de síntomas en las 24 horas anteriores (Tabla 1). Todas las muestras se manipularon y se analizaron por el Department of Clinical Biochemistry and Pharmacology at Odense University Hospital (Odense, Dinamarca).

Los pacientes del grupo 1 y 2 se reunieron de la cohorte DANRISK, una muestra aleatoria de 1825 hombres y mujeres de 50 a 60 años de edad, quienes en 2009 fueron invitados a someterse a pruebas de detección de enfermedad coronaria. El cribado incluía una tomografía computarizada cardíaca, seguida de una estimación de la cantidad de calcio coronario utilizando la puntuación de Agatston. De los individuos invitados, 1257 se consideraron para la detección, pero después de la exclusión de aquellos con cardiopatía isquémica previa o diabetes mellitus ( $n = 100$ ), 1157 pacientes se incluyeron para el análisis. Entre estos individuos de 60 años ( $n = 647$ ), se eligieron 30 pacientes sin calcio coronario detectable (CT-noCa), grupo 1 y 30 con una puntuación de Agatston  $\geq 400$  (CT-plusCa) del grupo 2. La selección de estos dos grupos también implicó la correspondencia del colesterol total y la presión arterial. HeartScore está dirigido a ayudar a los médicos a optimizar la reducción del riesgo cardiovascular individual. Esta estimación del riesgo se basa en los siguientes factores de riesgo: sexo, edad, tabaquismo, presión arterial sistólica y colesterol total, y predecirá la cantidad de eventos de CVD fatales que eventualmente tendrán lugar después de 10 años. El umbral de alto riesgo basado en eventos cardiovasculares fatales se define como "superior al 5%" (139).

El grupo de pacientes con IHD estable, grupo 3, provenía del The Odense Artery Biobank, que recopila muestras de sangre y tejido arterial sobrantes de pacientes sometidos a cirugía de derivación coronaria. Las muestras de sangre se tomaron el día antes de la operación de derivación. Se seleccionaron 30 pacientes con una edad media de aproximadamente 60 años y una distribución de género similar a las poblaciones mencionadas anteriormente. El grupo de pacientes con ACS, grupo 4, se agrupó de la cohorte de DEFAMI, en la que todos los pacientes ingresaron en el Odense University Hospital entre el 1 de octubre de 2009 y el 30 de abril de 2010 y se incluyeron los que tenían un análisis de troponina realizado bajo sospecha de ACS. En estos pacientes, se realizó un muestreo de sangre en serie dentro de las primeras 24 horas del inicio de los síntomas. De los 822 pacientes en la cohorte de DEFAMI, 30 pacientes con infarto de miocardio sin elevación de ST (NSTEMI,  $n = 24$ ) o angina de pecho inestable ( $n = 6$ ) se seleccionaron para participar en el estudio actual. Su edad era de aproximadamente 60 años y su distribución de género coincidió con los dos subgrupos DANRISK (grupo 1 y grupo 2). Se definió NSTEMI si se demostró un aumento y/o descenso típico de los niveles de TnI por encima de  $0,03 \mu\text{g/l}$  en asociación con la presencia de síntomas clínicos típicos. La angina de pecho inestable se definió como la presencia de dolor torácico típico durante el reposo o el esfuerzo físico mínimo junto con la depresión del segmento ST o las fluctuaciones de la onda T, pero con niveles normales de TnI (por debajo de  $0,03 \mu\text{g/l}$ ). Todos los pacientes con angina de pecho inestable también tuvieron que demostrar al menos una estenosis arterial coronaria significativa ( $>50\%$  de diámetro estenosis). Por lo tanto, en este estudio, los pacientes con ACS incluían pacientes con NSTEMI y angina de pecho inestable. Los pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI) no se incluyeron, ya que en estos pacientes no sería posible obtener muestras de sangre en serie suficientes antes de que se administrara la medicación con heparina y PCI aguda. Ambas intervenciones podrían interferir en los ensayos bioquímicos. El nivel medio de TnI en los 30 pacientes con ACS (grupo 4) era de  $0,62 \mu\text{g/l}$  (intervalo de  $0,01$ - $5,23 \mu\text{g/l}$ ).

En todos los pacientes, grupo 1-4 ( $n = 120$ ), se consideró la hipertensión si el paciente usaba tratamiento médico antihipertensivo y se definió la diabetes si se prescribió un medicamento antidiabético. La presión arterial sistólica y diastólica se midió el mismo día que la muestra de sangre. La puntuación de Agatston se calculó en el grupo 1 y 2 pacientes. TnI en el grupo ACS se midió inmediatamente en el ingreso hospitalario, antes de toma de la muestra de sangre actual. El colesterol total, LDL, HDL y los triglicéridos también se midieron antes de la toma de muestra de sangre para el presente estudio. Las muestras de sangre se extrajeron en tubos con EDTA y se centrifugaron a  $200g$  durante 10 min. El plasma se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis bioquímico.

Los protocolos de estudio para los estudios DANRISK, DEFAMI y Odense Artery Biobank se aprobaron por el Regional Ethics Committee antes del inicio de los estudios. El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes participantes.

**Tabla 50.** Demografía de cada grupo incluido en el estudio con valores medios y desviación estándar en [].

|                                            | CT-noCa $n = 30$  | CT-plus Ca $n = 30$ | ACS $n = 30$        | IHD $n = 30$      | Valor de p ANOVA |
|--------------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| <b>Edad (años)</b>                         | 60,2 [59,8; 60,7] | 60,3 [60,0- 60,6]   | 64,5** [56,0; 73,0] | 59,7 [56,8; 62,6] | 0,0001           |
| <b>Triglicéridos<sup>#</sup> (mmol/l)</b>  | 1,57 [0,85; 2,93] | 1,49 [1,00; 2,21]   | 1,30 [0,78; 2,19]   | 1,48 [0,92; 2,30] | 0,52             |
| <b>Colesterol HDL<sup>#</sup> (mmol/l)</b> | 1,28 [0,93; 1,75] | 1,36 [0,98; 1,89]   | 1,13 [0,83; 1,52]   | 1,30 [0,90; 1,87] | 0,14             |

|                                           | CT-noCa n = 30    | CT-plus Ca n = 30  | ACS n = 30        | IHD n = 30         | Valor de p ANOVA |
|-------------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| <b>Colesterol LDL (mmol/l)</b>            | 3,14 [2,13; 4,16] | 3,26 [2,29; 4,22]  | 2,93 [1,74; 4,11] | 2,41* [1,27; 3,55] | 0,02             |
| <b>Colesterol total (mmol/l)</b>          | 5,25 [4,06; 6,43] | 5,47 [4,29; 6,64]  | 4,74 [3,44; 6,04] | 4,45* [3,20; 5,71] | 0,007            |
| <b>Presión arterial sistólica (mmHg)</b>  | 145 [131; 159]    | 147 [128; 167]     | 159* [132; 187]   | 145 [123; 168]     | 0,04             |
| <b>Presión arterial diastólica (mmHg)</b> | 86 [76; 95]       | 85 [75; 96]        | 88 [72; 103]      | 83 [74; 92]        | 0,56             |
| <b>Puntuación Agatston<sup>#</sup></b>    | 0                 | 1299 [717; 2352]   | -                 | -                  | -                |
| <b>HeartScore<sup>#</sup></b>             | 6,33 [2,23; 8,92] | 8,30 [3,10; 12,42] | -                 | -                  | 0,3              |

CT-noCa: Individuos asintomáticos sin calcio coronario detectable;  
 CT-plusCa: CVD asintomática con alto calcio coronario; ACS (Síndrome coronario agudo);  
 IHD: Pacientes con cardiopatía isquémica estable. Valores medios [+/- EST.];  
<sup>#</sup> Valores medios geométricos [+/- EST.], y valor de p de una forma de análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significancia de los valores de p de la comparación de cada grupo contra el grupo de control "CT-noCa" se ajustó para comparaciones múltiples mediante el método de Dunnet (\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

**Tabla 51.** Los resultados de las curvas ROC en el grupo de calcio coronario alto (CT-plus Ca), de síndrome coronario agudo (ACS) y de cardiopatía isquémica (IHD) en comparación con el grupo control sin calcio coronario detectable (CT-no Ca). AUC se da con error estándar y valores de p.

| Curva ROC; Valor de p de AUC [error est.] |                              |                             |                          |
|-------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Parámetro                                 | CT-plus Ca frente a CT-no Ca | ACS frente a CT-no Ca       | IHD frente a CT-no Ca    |
| VCAN-3306                                 | 0,748<br>[0,068]<br>0,0003   | 0,775<br>[0,062]<br><0,0001 | 0,669<br>[0,077]<br>0,03 |

5

**Tabla 52.** Los coeficientes de correlación de Spearman de VCAN-3306 y los parámetros medidos estándar se presentan con valores de r y valores de p.

| Coefficientes de correlación de Spearman | Valor de r y valor de p de todos los grupos | CT-plus Ca                | ACS                   | IHD                   |
|------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Edad</b>                              | 0,1675<br>0,4038                            | -0,0147<br>0,9386         | -<br>0,1387<br>0,4647 | 0,0769<br>0,7027      |
| <b>Triglicéridos</b>                     | -0,1011<br>0,6160                           | 0,3281<br>0,0767          | 0,1409<br>0,4577      | -<br>0,0806<br>0,6895 |
| <b>LDL</b>                               | -0,2291<br>0,2503                           | 0,4665<br><b>0,0094**</b> | 0,3186<br>0,0862      | -<br>0,1394<br>0,4880 |
| <b>HDL</b>                               | -0,0501<br>0,8041                           | 0,1945<br>0,3030          | 0,0309<br>0,8714      | 0,2688<br>0,1752      |
| <b>Total</b>                             | -0,2062                                     | 0,5993                    | 0,3187                | 0,0504                |
| <b>Colesterol</b>                        | 0,3022                                      | <b>0,0005***</b>          | 0,0860                | 0,8028                |
| <b>PA sistólica</b>                      | 0,2745<br>0,1659                            | 0,0982<br>0,6057          | 0,1953<br>0,3011      | -<br>0,0527<br>0,8304 |
| <b>PA diastólica</b>                     | 0,0266<br>0,8952                            | 0,2060<br>0,2747          | 0,0720<br>0,7053      | 0,0330<br>0,8933      |

La Figura 9 muestra los resultados de una prueba de especificidad de anticuerpos hacia su epítipo. Las muestras añadidas y ensayadas en un entorno ELISA competitivo fueron: péptido alargado (20 ng/ml), versicano no escindido (VCAN), versicano escindido por MMP-8 (VCAN + MMP8), versicano escindido por MMP-12 (VCAN + MMP12) y versicano escindido por cathepsina K (VCAN + CatK).

La Figura 10 muestra los niveles plasmáticos de VCAN-3306 medidos en pacientes diagnosticados con síndrome coronario agudo (ACS), depósitos elevados de calcio coronario (CT-plus Ca), cardiopatía isquémica estable (IHD) y comparados con controles emparejados por edad que comprendían individuos sin depósitos de calcio coronario detectables (CT-no Ca). \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ ; se muestran valores individuales y la media del grupo y SEM como barras de línea y error.

La Figura 11 muestra curvas ROC para a) VCAN-3306 combinado con LDL y b) VCAN-3306 combinado con colesterol en el grupo de pacientes asintomáticos con altos depósitos de calcio coronario (CT-plus Ca).

#### 10 **Ejemplo 8 Ensayo de tipo V de NB185: C5M .HMGREGREGE (SEQ ID NO 93)**

La inflamación crónica de la espondilitis anquilosante (AS) de la columna vertebral puede conducir a una cementación completa de las vértebras, un proceso que incluye la renovación de varios colágenos encontrados en la articulación. La evaluación diagnóstica y la caracterización del paciente pueden mejorarse mediante la medición de los marcadores de renovación del tejido conectivo. La degradación proteolítica de los colágenos desempeña un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular y, por lo tanto, en la patogénesis de la AS. Esta degradación crea pequeños fragmentos peptídicos llamados neo-epítomos, que pueden resultar ser una nueva clase de biomarcadores de eventos fibróticos. Los objetivos de este estudio fueron desarrollar un ELISA competitivo capaz de detectar un fragmento de colágeno de tipo V generado por MMP-2 y MMP-9 y evaluar el uso de este ensayo como biomarcador para AS.

*Materiales y métodos:* El análisis espectrométrico de masas del colágeno de tipo V degradado por MMP-2 y MMP-9 reveló un gran número de neo-epítomos generados por proteasas. A partir de estos datos, se seleccionó un fragmento único para el colágeno de tipo V y generado por MMP-2 y MMP-9 como objetivo para el desarrollo de ELISA. Se generó un anticuerpo monoclonal contra este neo-epítomo, que detectó el fragmento de colágeno de tipo V en la posición de aminoácido 1317 (CO5-MMP). El ensayo se utilizó para evaluar el contenido del neo-epítomo CO5-MMP en suero de 40 pacientes con AS y 40 controles emparejados por edad.

*Resultados:* Se demostró que el ELISA detecta el fragmento de neo-epítomo CO5-MMP de la degradación de MMP-2 y MMP-9 exclusivamente con variaciones inter e intraensayos del 9,13% y del 4,38% respectivamente. El nivel de CO5-MMP fue significativamente mayor en los pacientes con AS, con un aumento del 229% ( $P < 0,0001$ ). El AUC era del 83%.

*Conclusiones:* Este nuevo ELISA es el primer ensayo desarrollado para evaluar los neo-epítomos de colágeno de tipo V. La alta renovación del colágeno de tipo V sugiere un papel fisiopatológico. CO5-MMP es un marcador candidato de la fibrogénesis en curso.

#### **Métodos**

##### 40 **Sujetos sanos y pacientes con AS**

Los marcadores bioquímicos se evaluaron en suero de pacientes diagnosticados con espondilitis anquilosante (AS, de acuerdo con los criterios de Nueva York modificados) y se compararon con muestras de suero sin enfermedad del mismo sexo y edad del Department of Medicine 3 de la University of Erlangen-Nuremberg. El grupo sin enfermedad consistió en 21 mujeres sanas y 19 hombres sanos con una edad media de 43,0 años, rango de 18 a 66. El grupo de AS consistió en 19 mujeres y 21 hombres con una edad media de 42,5 años, rango 29 a 63 años. (Tabla 53)

#### **Metodología ELISA CO5-MMP**

En experimentos preliminares, se optimizaron los reactivos, sus concentraciones y los periodos de incubación realizando varios análisis de tablero de ajedrez. La ELISA CO5-MMP se desarrolló de la siguiente manera: Una placa de estreptavidina de 96 pocillos se recubrió con 5 ng/ml de péptido sintético biotinilado HMGREGREGE-K-Biotina (SEQ ID NO 307) disuelta en tampón de ensayo (Tris 25 mM, BSA al 1%, Tween-20 al 1%, pH 7,4) y se incubaron 30 minutos a 20°C agitando constantemente a 300 rpm. Se añadieron veinte µl de calibrador de péptidos o muestra disuelta en el tampón de ensayo a los pocillos apropiados, seguido de 100 µl de anticuerpo monoclonal conjugado (125 ng/ml) y se incubaron durante 1 hora a 4°C con agitación constante a 300 rpm. Finalmente, se añadieron 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) (Kem-En-Tec cat. n.º 438OH) y la placa se incubó durante 15 minutos a 20°C en la oscuridad y se agitó a 300 rpm. Después de cada etapa de incubación, la placa se lavó cinco

veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). La reacción de TMB se detuvo añadiendo 100 µl de solución de parada (HCl al 1%) y se midió espectrofotométricamente a 450 nm con 650 nm como referencia. Se realizó una curva estándar mediante dilución en serie del péptido CO5-MMP (HMGREGREGE) y se representó mediante un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros. Las concentraciones estándar fueron 0, 15,625, 31,25, 5 62,5, 125, 250, 500, 1000 ng/ml.

**Tabla 53. Descripción del estudio**

|                            | Controles               | AS                      |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>N (Mujeres/Hombres)</b> | 40 (21/19)              | 40 (19/21)              |
| <b>Edad (rango)</b>        | 43,0 años (18-66)       | 42,5 años (29-63)       |
| <b>CRP [95% de CI]</b>     | 3016 ng/ml [1595, 4438] | 4061 ng/ml [2426, 5696] |
| <b>BASDAI</b>              |                         | 3,79 [0,01, 0,45]       |
| <b>mSASSS</b>              |                         | 5,08 [0,04, 1,14]       |

La Figura 12 muestra los resultados obtenidos en una caracterización del ELISA de CO5-MMP que muestra el porcentaje de inhibición de la señal de: A) Péptido libre (HMGREGREGE), colágeno de tipo V intacto, colágeno de tipo V escindido por MMP-9, colágeno de tipo V escindido por MMP-2; B) Péptido libre (HMGREGREGE), colágeno de tipo V escindido por MMP-13, colágeno de tipo I escindido por MMP-9, péptido alargado (GHMGREGREG).

La Figura 13 muestra los resultados de la medición de CO5-MMP en sujetos no enfermos (ND, n = 40) y en pacientes con espondilitis anquilosante (AS, n = 40). Las barras indican niveles medios ± error estándar de la media (SEM). Los grupos se compararon por Mann-Whitney.

#### **Ejemplo 9 - Elastina ELN-552 (ELM-2) GVAPGIGPGG. (SEQ ID NO 308)**

## **20 Materiales y Métodos**

**Tabla 54. Descripción del programa de neo-epítipo de elastina.** Una flecha apuntando hacia abajo indica el sitio de escisión, y el aminoácido alargado para el péptido alargado está subrayado.

| Programa Número | Secuencia diana (humana) | Descripción de diana                                            | Homología  | ID                                          | Péptidos de selección y desección. |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------|------------------------------------|
| NB244           | GIGPGG↓ Aa 547-552       | Elastinas escindida por MMP9/12 como un marcador de degradación | Ser humano | Escisiones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | gvapGIGPGG                         |
|                 | Ensayo ELN-552           |                                                                 |            |                                             | gvapGIGPGGVA<br>SEQ ID NO 309      |

## **25 Procedimiento ELISA ELN-552 (ELM2)**

El tampón de ensayo y las placas se equilibraron a temperatura ambiente. Se usaron 100 µl de péptido biotinilado (biotina-CGG-GVAPGIGPGG SEQ ID NO 287) diluido a 2,5 ng/ml en tampón de ensayo (PBS 50 mM, BSA al 1%, Tween-20 al 0,1%, pH 7,40) para recubrir placas recubiertas con estreptavidina de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 20°C, con agitación a 300 rpm, y se lavaron cinco veces en tampón de lavado (tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). Cada muestra de suero se diluyó 2 veces en tampón de ensayo y se añadieron a cada pocillo 20 µl de dilución de suero o calibrador peptídico (comenzando en 250 ng/ml). Se añadieron 100 µl de anticuerpo NB244-2B4 marcado con HRP a una concentración de 65 ng/ml a cada pocillo y la placa se dejó incubar durante 1 hora a 20°C, agitando a 300 rpm. Las placas se lavaron cinco veces en tampón de lavado, se añadieron 100 µl de TMB, y la placa se incubó durante 15 minutos a 20°C en la oscuridad. Se añadieron 100 µl de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%) y la placa se leyó en un lector ELISA a 450 nm con 650 nm como referencia. Se ajustó una curva de calibración utilizando un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros.

#### **Validación clínica del ensayo ELN-552**

El ensayo ELN-552 se ensayó en la cohorte BioCore, que es una cohorte de aterosclerosis. La cohorte se realizó sin diluir en el ensayo. Los pacientes de la cohorte de BioCore se dividen en cuatro grupos de acuerdo con los síntomas clínicos: el grupo con AMI, que son pacientes con infarto agudo de miocardio confirmado, el grupo sin AMI, que son pacientes con sospecha de AMI, pero sin diagnóstico basado en los niveles de troponina-T, el grupo de calcio coronario alto, que son pacientes que presentan calcio coronario alto basado en una puntuación agatston pero sin

síntomas clínicos, y el grupo sin calcio coronario, que es el grupo de control negativo. Los pacientes en el grupo sin calcio coronario fueron elegidos al azar en función de su número de CRP y no tienen síntomas clínicos o indicación de biomarcadores de aterosclerosis. Todos están emparejados por sexo y edad con el resto de la cohorte. En cada grupo hay 30 pacientes, por lo que es un estudio de 120 pacientes. Una tabla demográfica de algunos de los datos de BioCore se observa en la Tabla 55.

**Tabla 55. Los datos demográficos sobre la cohorte BioCore.**

| Grupo                      | Edad (años) | PA sist. (mmHg) | PA diast. (mmHg) | Colesterol total (mmol/l) | HDL (mmol/l) | LDL (mmol/l) | Puntuación de Agatston | Heart score* |
|----------------------------|-------------|-----------------|------------------|---------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
| AMI (n = 30)               | 64,5 ± 9    | 159 ± 28        | 88 ± 16          | 4,7 ± 1,3                 | 1,2 ± 0,3    | 2,9 ± 1,2    | ---                    | 9,7 ± 5,4    |
| No AMI (n = 30)            | 60,2 ± 8    | 143 ± 26        | 81 ± 14          | 4,9 ± 0,9                 | 1,5 ± 0,7    | 2,7 ± 0,7    | 498**                  | 8,7 ± 5,7    |
| Ca coronario alto (n=30)   | 60,3 ± 0,3  | 147 ± 20        | 86 ± 11          | 5,5 ± 1,2                 | 1,4 ± 0,5    | 3,3 ± 1      | 1509 ± 1070            | 8,3 ± 6,2    |
| Sin Ca. coronario (n = 30) | 60,3 ± 0,4  | 145 ± 14        | 86 ± 10          | 5,2 ± 1,2                 | 1,3 ± 0,4    | 3,1 ± 1      | 0,00                   | 6,3 ± 4,5    |

Los valores son la media ± desviación estándar.

Ca coronario alto: el grupo de calcio coronario alto,

Sin Ca coronario: el grupo sin calcio coronario.

PA: Presión arterial

\*Heart score es una evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular de acuerdo con la edad, la presión arterial sistólica, el colesterol total en mmol/L, y el estado de fumador.

\*\*Puntuación de Agatston de un solo paciente.

## Estadística

Después de ensayar las dos cohortes en el ensayo ELN-552, los datos se verificaron para determinar la distribución gaussiana utilizando una prueba de omnibus D'Agostino-Pearson y comprobando visualmente la distribución mediante la creación de un histograma. Los diferentes grupos se ensayaron entonces para determinar la diferencia utilizando una prueba t no paramétrica.

## Resultados

### ELN-552 está elevado en pacientes con infarto de miocardio agudo

El ELN-552 se ensayó en la cohorte de aterosclerosis BioCore. Los niveles de ELN-552 fueron significativamente más altos en el suero de pacientes con AMI en comparación con los no AMI ( $p < 0,01$ ). Los pacientes se dividen en grupos de acuerdo con los síntomas clínicos y los marcadores de imagen. La barra que cubre los grupos AMI y no AMI indica una diferencia significativa entre estos grupos calculada por una prueba t no paramétrica. \*\* indica un valor de p inferior a 0,01. Para comparación, el eje y tiene el mismo valor que en. Al usar una prueba t no paramétrica, es evidente que la mayor diferencia entre los grupos se encuentra entre los grupos AMI y no AMI. Entre el grupo AMI y el grupo sin calcio coronario hubo una diferencia casi significativa de  $p = 0,07$  y entre los grupos no AMI y de calcio coronario alto hubo un valor de p de 0,08, lo que sugiere que los grupos de pacientes más grandes y, por lo tanto, de más potencia, podrían confirmar estas diferencias y caracterizar adicionalmente el ensayo.

En esta memoria descriptiva, a menos que se indique expresamente otra cosa, la palabra "o" se usa en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumple una o las dos condiciones establecidas, a diferencia del operador "exclusivo o" lo que requiere que solo se cumpla una de las condiciones. La palabra "que comprende" se usa en el sentido de "incluir" en lugar de significar "que consiste en". No debe considerarse ningún conocimiento de ningún documento publicado anteriormente en el presente documento como una admisión o representación de que la enseñanza del mismo era de conocimiento general en Australia o en otro lugar en la fecha de la presente.

## Lista de bibliografía

1. World Health Organization. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Reducing Risks, Promoting Healthy Life, Geneva: WHO, 2002:1-230.

2. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
3. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105.
4. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.
5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117:524-529.
6. Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S47-S56.
7. Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425.
8. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-C9.
9. Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):307-313.
10. Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc Res Tech* 1997;38:407-412.
11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-1546.
12. Phan SH, Thrall RS. Pulmonary Fibrosis. *Lung Biology in Health and Disease*. 80 ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.
13. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:77-84.
14. Gilliam AC. Scleroderma. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:258-279.
15. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76-99.
16. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-2051.
17. Svensson L, Oldberg A, Heinegard D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:S23-S28.
18. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12:19-32.
19. Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem* 1987;262:13120-13125.
20. Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 1999;72:210-220.
21. Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem* 1992;267:19536-19547.
22. Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 1994;269:10119-10126.
23. Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 1992;267:20613-20619.
24. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989;264:4571-4576.
25. Toyama-Sorimachi N, Sorimachi H, Tobita Y, Kitamura F, Yagita H, Suzuki K, Miyasaka M. A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* 1995;270:7437-7444.
26. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24:153-166.
27. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444.
28. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol* 1999;147:909-912.
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
30. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver*

Dis 2001;21:373-384.

31. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007;27:413-426.

32. Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996;24:176-184.

33. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 2006;107:1397-1404.

34. Acharya PS, Zukas A, Chandan V, Katzenstein AL, Pure E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 2006;37:352-360.

35. Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, Gorrell MD. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection. *Liver* 2002;22:93-101.

36. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2006;73:490-494.

37. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137.

38. McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S32-S38.

39. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998;15:22-37.

40. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007;381:107-113.

41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 2007;11:1031-1051.

42. Mariat C. [Diagnosis and follow-up of chronic kidney graft dysfunction: from DFG to new biomarkers]. *Nephrol Ther* 2008;4 Suppl 3:S204-S207.

43. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007;42:573-582.

44. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DG, Petrik J, Alexander GJ. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998;5:187-192.

45. Parise ER, Oliveira AC, Figueiredo-Mendes C, Lanzoni V, Martins J, Nader H, Ferraz ML. Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2006;26:1095-1099.

46. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:945-951.

47. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.

48. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Masnou H, Montoliu S, Morillas RM, Planas R. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (igf-I) as a marker of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:3245-3250.

49. Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2007;7:17.

50. Camacho VR, Silveira TR, Oliveira JR, Barros SG, Cerski CT. Relationship between serum concentrations of type III procollagen, hyluronic acid and histopathological findings in the liver of HCV-positive blood donors. *Arq Gastroenterol* 2007;44:118-122.

51. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:775-782.

52. Trocme C, Leroy V, Sturm N, Hilleret MN, Bottari S, Morel F, Zarski JP. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat* 2006;13:643-651.

53. Zheng M, Cai WM, Weng HL, Liu RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1073-1076.

54. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Serum

fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:843-848.

55. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *World J Gastroenterol* 2006;12:3338-3343.

56. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1128-1136.

57. Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41:935-942.

58. Lieber CS, Weiss DG, Paronetto F. Value of fibrosis markers for staging liver fibrosis in patients with precirrhotic alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:1031-1039.

59. Fornis X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, Bruguera M, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986-992.

60. Bourliere M, Penaranda G, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Lecomte L, Castellani P, Rosenthal-Allieri MA, Gerolami R, Ouzan D, Deydier R, Degott C, Halfon P. Validation and comparison of indexes for fibrosis and cirrhosis prediction in chronic hepatitis C patients: proposal for a pragmatic approach classification without liver biopsies. *J Viral Hepat* 2006;13:659-670.

61. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Perronne C, Pol S, Halfon P. Comparison of non-invasive liver fibrosis biomarkers in HIV/HCV co-infected patients: the fibrovis study--ANRS HC02. *J Hepatol* 2008;48:765-773.

62. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.

63. Grigorescu M, Rusu M, Neculoiu D, Radu C, Serban A, Catanas M, Grigorescu MD. The FibroTest value in discriminating between insignificant and significant fibrosis in chronic hepatitis C patients. The Romanian experience. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:31-37.

64. Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007;46:395-402.

65. Halfon P, Bourliere M, Deydier R, Botta-Fridlund D, Renou C, Tran A, Portal I, Allemand I, Bertrand JJ, Rosenthal-Allieri A, Rotily M, Sattinet C, Benderitter T, Saint Paul MC, Bonnot HP, Penaranda G, Degott C, Masseyeff MF, Ouzan D. Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:547-555.

66. Leroy V, Halfon P, Bacq Y, Boursier J, Rousselet MC, Bourliere M, De MA, Sturm N, Hunault G, Penaranda G, Brechot MC, Trocme C, Cales P. Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data. *Clin Biochem* 2008;41:1368-1376.

67. Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Le BB, de L, V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006;6:6.

68. Poynard T, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Chevret S, Jardel C, Moussalli J, Messous D, Degos F. Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *J Viral Hepat* 2002;9:128-133.

69. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.

70. Poynard T, Morra R, Halfon P, Castera L, Ratzu V, Imbert-Bismut F, Naveau S, Thabut D, Lebrech D, Zoulim F, Bourliere M, Cacoub P, Messous D, Munteanu M, de L, V. Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease. *BMC Gastroenterol* 2007;7:40.

71. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-1896.

72. Naveau S, Raynard B, Ratzu V, Abella A, Imbert-Bismut F, Messous D, Beuzen F, Capron F, Thabut D, Munteanu M, Chaput JC, Poynard T. Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic

alcoholic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:167-174.

73. Myers RP, Tainturier MH, Ratzu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.

74. Jacqueminet S, Lebray P, Morra R, Munteanu M, Devers L, Messous D, Bernard M, Hartemann-Heurtier A, Imbert-Bismut F, Ratzu V, Grimaldi A, Poynard T. Screening for liver fibrosis by using a noninvasive biomarker in patients with diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:828-831.

75. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.

76. Poynard T, Zoulif F, Ratzu V, Degos F, Imbert-Bismut F, Deny P, Landais P, El HA, Slama A, Blin P, Thibault V, Parvaz P, Munteanu M, Trepo C. Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1970-1980.

77. Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le CS, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2004;50:1344-1355.

78. Myers RP, Tainturier MH, Ratzu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, Messous D, Charlotte F, Di M, V, Benhamou Y, Poynard T. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:222-230.

79. Carvalho-Filho RJ, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Sampaio JP, Lanzoni VP, Ferraz ML, Silva AE. Optimized cutoffs improve performance of the aspartate aminotransferase to platelet ratio index for predicting significant liver fibrosis in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection. *Liver Int* 2008;28:486-493.

80. Al-Mohri H, Cooper C, Murphy T, Klein MB. Validation of a simple model for predicting liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *HIV Med* 2005;6:375-378.

81. Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol* 2008.

82. Paggi S, Colli A, Fraquelli M, Vigano M, Del PP, Facciotto C, Colombo M, Ronchi G, Conte D. A non-invasive algorithm accurately predicts advanced fibrosis in hepatitis C: a comparison using histology with internal-external validation. *J Hepatol* 2008;49:564-571.

83. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta* 2008;397:51-54.

84. Snyder N, Gajula L, Xiao SY, Grady J, Luxon B, Lau DT, Soloway R, Petersen J. APRI: an easy and validated predictor of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:535-542.

85. Snyder N, Nguyen A, Gajula L, Soloway R, Xiao SY, Lau DT, Petersen J. The APRI may be enhanced by the use of the FIBROSpect II in the estimation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2007;381:119-123.

86. Hongbo L, Xiaohui L, Hong K, Wei W, Yong Z. Assessing routine and serum markers of liver fibrosis in CHB patients using parallel and serial interpretation. *Clin Biochem* 2007;40:562-566.

87. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.

88. Adams LA, Bulsara M, Rossi E, DeBoer B, Speers D, George J, Kench J, Farrell G, McCaughan GW, Jeffrey GP. Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem* 2005;51:1867-1873.

89. Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y. FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007;45:297-306.

90. Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2007;52:582-588.

91. Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H, Forouzanfar MH, Abedian S, Tavangar SM, Mohamadkhani A, Ghoujehi F, Estakhri A, Nouri N, Farzadi Z, Najjari A, Malekzadeh R. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-virus related liver disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2537-2545.

92. Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K. Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med* 2007;120:280-14.

93. Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROSpect II with histologic and morphometric evaluation of liver

fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:242-247.

94. Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:686-693.

95. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.

96. Nunes D, Fleming C, Offner G, O'Brien M, Tumilty S, Fix O, Heeren T, Koziel M, Graham C, Craven DE, Stuver S, Horsburgh CR, Jr. HIV infection does not affect the performance of noninvasive markers of fibrosis for the diagnosis of hepatitis C virus-related liver disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:538-544.

97. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005;128:343-350.

98. Guanabens N, Pares A, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, Monegal A, Peris P, Ballesta AM, Rodes J. Collagen-related markers of bone turnover reflect the severity of liver fibrosis in patients with primary biliary cirrhosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:731-738.

99. Moller S, Hansen M, Hillingso J, Jensen JE, Henriksen JH. Elevated carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen in alcoholic cirrhosis: relation to liver and kidney function and bone metabolism. *Gut* 1999;44:417-423.

100. Rosen HN, Parker RA, Greenspan SL, Iloputaife ID, Bookman L, Chapin D, Perlmutter I, Kessel B, Qvist P, Rosenblatt M. Evaluation of ability of biochemical markers of bone turnover to predict a response to increased doses of HRT. *Calcif Tissue Int* 2004;74:415-423.

101. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA, Jung K. Serial Markers of Bone Turnover in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid for Detection of Bone Metastases Progression. *Eur Urol* 2007.

102. Attallah AM, Toson EA, Shiha GE, Omran MM, bdel-Aziz MM, El-Dosoky I. Evaluation of serum procollagen aminoterminal propeptide III, laminin, and hydroxyproline as predictors of severe fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Immunoassay Immunochem* 2007;28:199-211.

103. Ulrich D, Noah EM, von HD, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:1423-1431.

104. Farkkila M, Rautiainen H, Karkkainen P, Karvonen AL, Nurmi H, Niemela O. Serological markers for monitoring disease progression in noncirrhotic primary biliary cirrhosis on ursodeoxycholic acid therapy. *Liver Int* 2008;28:787-797.

105. Guechot J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatol* 1994;20:388-393.

106. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG, . Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995;75:913-918.

107. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.

108. Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T., Salvesen, G., and Nagase, H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29:10261-10270.

109. Lijnen, H.R. 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86:324-333.

110. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol* 2010 Jul;6(7):399-405.

111. Braun J, Pincus T. Mortality, course of disease and prognosis of patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Nov;20(6 Suppl 28):S16-S22.

112. Kumar VAAKFN. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders, 2005. 87-118.

113. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001 Aug;21(3):351-372.

114. Lochter A, Bissell MJ. An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases. *APMIS* 1999 Jan;107(1):128-136.

115. Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Res Ther* 2008;10(3):R63.

116. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Mitchell P, Duffin K, Barascuk N, et al. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and

provide unique and necessary tools for drug development. *Biomarkers* 2009 May;14(3):181-202.

117. Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, et al. Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatol Int* 2010 Feb;30(4):435-442.

118. Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA, et al. Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2008 Aug;58(8):2420-2431.

119. Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002 Feb;316(1-2):71-81.

120. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007 May;46(5):955-975.

121. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in donor liver, cirrhotic liver, and acute rejection after human liver transplantation. *Transplant Proc* 2008 Dec;40(10):3574-3577.

122. Schaller S, Henriksen K, Hoegh-Andersen P, Sondergaard BC, Sumer EU, Tanko LB, et al. In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: how biomarkers can assist? *Assay Drug Dev Technol* 2005 Oct;3(5):553-580.

123. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 2004 Dec 17;279(51):53331-53337.

124. Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, et al. Identification of binding partners interacting with the alpha1-N-propeptide of type V collagen. *Biochem J* 2010 Dec 22;433(2):371-381.

125. Berendsen AD, Bronckers AL, Smit TH, Walboomers XF, Everts V. Collagen type V enhances matrix contraction by human periodontal ligament fibroblasts seeded in three-dimensional collagen gels. *Matrix Biol* 2006 Oct;25(8):515-522.

126. Murasawa Y, Hayashi T, Wang PC. The role of type V collagen fibril as an ECM that induces the motility of glomerular endothelial cells. *Exp Cell Res* 2008 Dec 10;314(20):3638-3653.

127. Vassiliadis E, Veidal SS, Simonsen H, Larsen DV, Vainer B, Chen X, et al. Immunological detection of the type V collagen propeptide fragment, PVCP-1230, in connective tissue remodeling associated with liver fibrosis. *Biomarkers* 2011 May 25.

128. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 1988 Mar;106(3):999-1008.

129. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, et al. COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *Am J Hum Genet* 2000 Jun;66(6):1766-1776.

130. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet* 2000 Jun;66(6):1757-1765.

131. Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG. Mutations of the alpha2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce ehlers-danlos syndrome type I. *Hum Mol Genet* 1998 Feb;7(2):249-255.

132. Geffer ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977 Mar;3(2):231-236.

133. Segovia-Silvestre T, Reichenbach V, Fernandez-Varo G, Vassiliadis E, Barascuk N, Morales-Ruiz M, Karsdal MA, Jimenez W. Circulating CO3-610, a degradation product of collagen III, closely reflects liver collagen and portal pressure in rats with fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 19

134. Clarià J, Jimenez W. Renal dysfunction and ascites in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. 1999; 379-96

135. Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, Tugues S, Morales-Ruiz M, Alvarez CE, Friedman SL, Arroyo V, Jimenez W. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 475-83

136. Veidal SS, Karsdal MA, Nawrocki A, Larsen MR, Dai Y, Zheng Q, Hagglund P, Vainer B, Skjot-Arkil H, Leeming DJ. Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 22

137. Veidal SS, Vassiliadis E, Barascuk N, Zhang C, Segovia-Silvestre T, Klickstein L, Larsen MR, Qvist P, Christiansen C, Vainer B, Karsdal MA. Matrix metalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. *Liver Int* 2010; 30: 1293-304

138. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *JAMA* 1994; 271: 289-94

139. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De BG, De BD, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24: 987-1003

## REIVINDICACIONES

1. Un método de bioensayo que comprende realizar un inmunoensayo para medir los fragmentos de proteínas que contienen neo-epítopos presentes de forma natural en una muestra de biofluido, en el que dicho  
5 inmunoensayo se realiza mediante un método que comprende:  
poner en contacto los fragmentos de proteínas presentes de forma natural en dicha muestra con una pareja de unión inmunológica específicamente reactiva con un neo-epítipo formado por escisión de una proteína por una proteinasa y medir la extensión de la unión de fragmentos peptídicos a dicha pareja de unión inmunológica para medir en la  
misma fragmentos de proteína que comprenden dicho neo-epítipo, en el que dicha pareja de unión inmunológica es  
10 específicamente reactiva con la siguiente secuencia en el terminal N de un péptido: KTFGKM
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha detección de unión es cuantitativa.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de unión se compara con los  
15 valores de control establecidos para poblaciones de individuos sanos y de individuos **caracterizados por** una enfermedad fibrótica o por una afección inflamatoria.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, realizado como un ensayo de competición de tal  
manera que los péptidos en dicha muestra compiten por la unión al anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una  
20 concentración conocida de un agente de unión que se une a dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

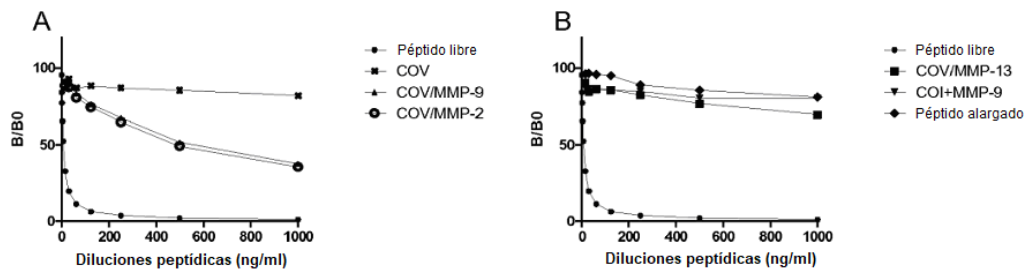


Figura 1

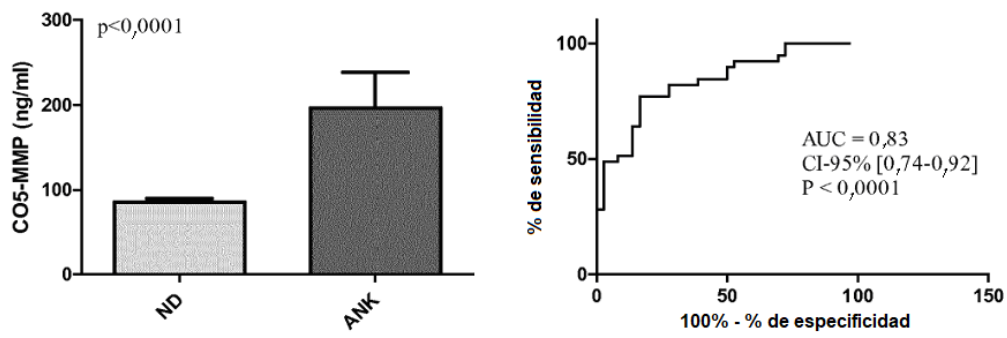


Figura 2

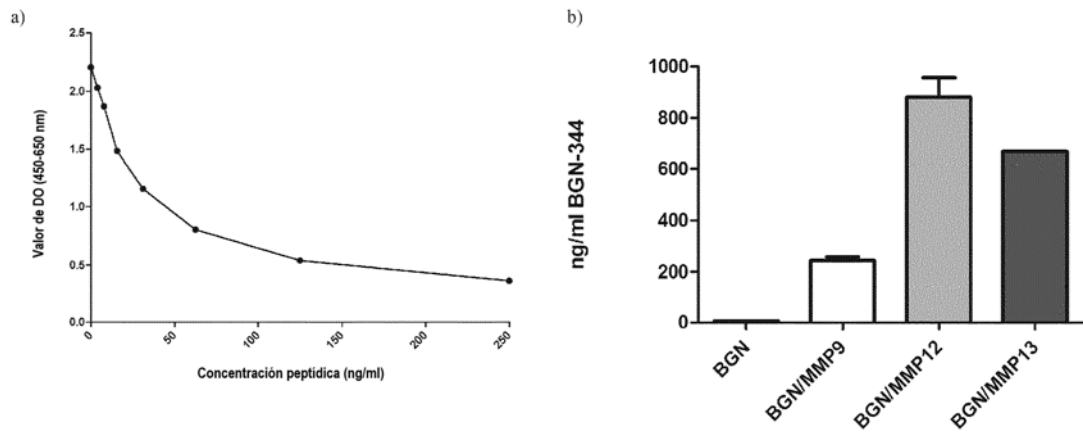


Figura 3

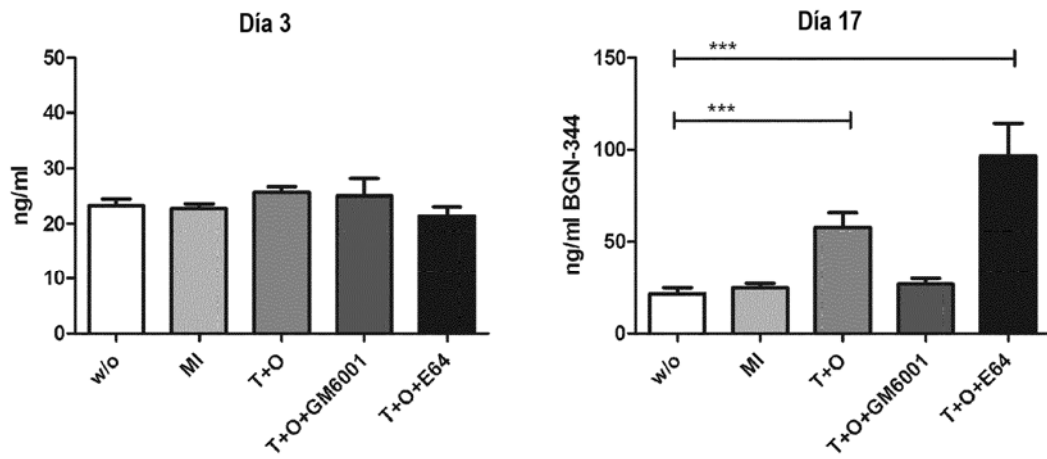


Figura 4

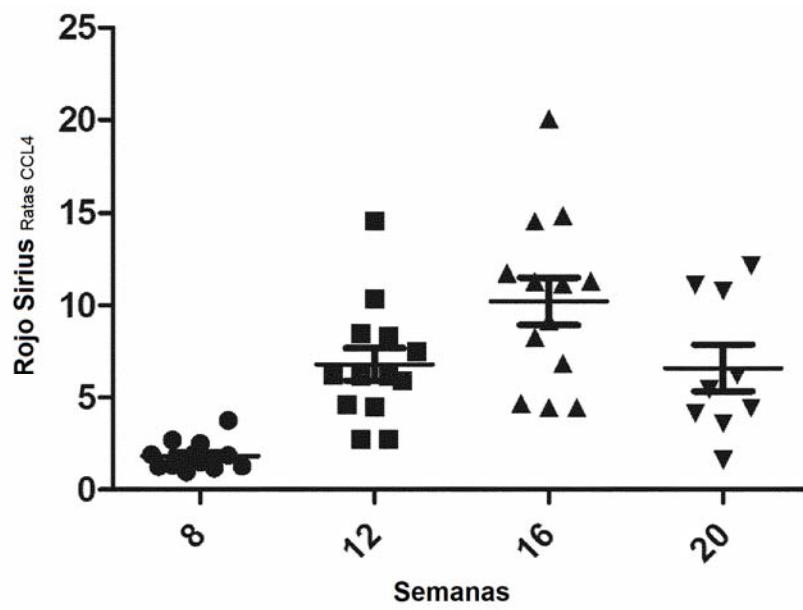


Figura 5

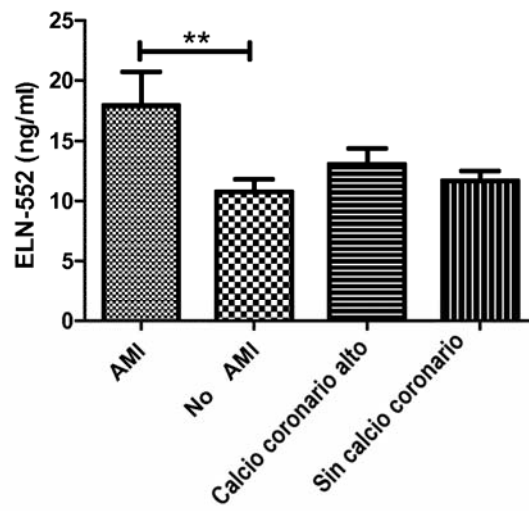


Figura 14

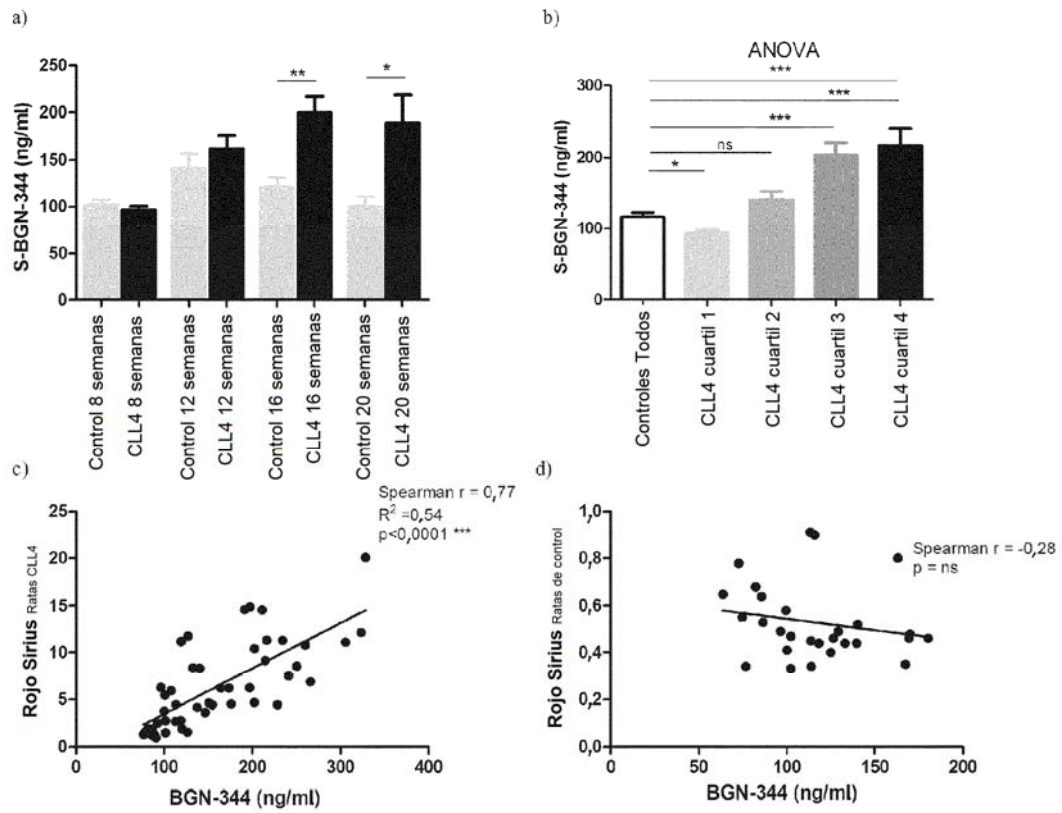


Figura 6

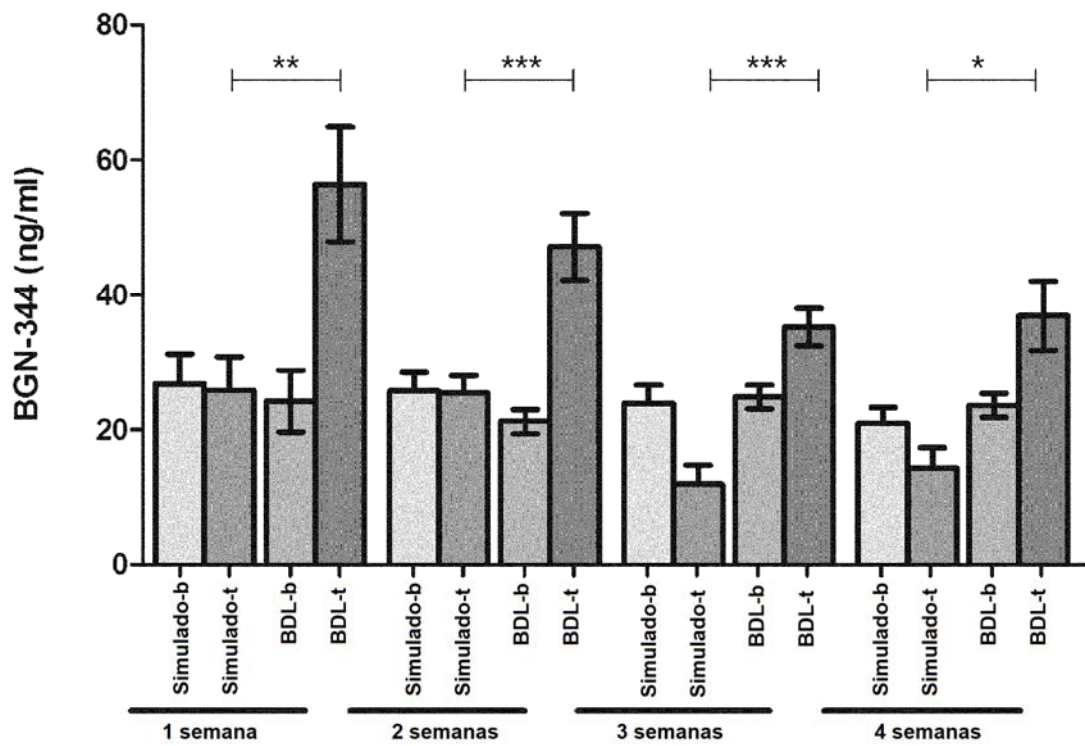


Figura 7

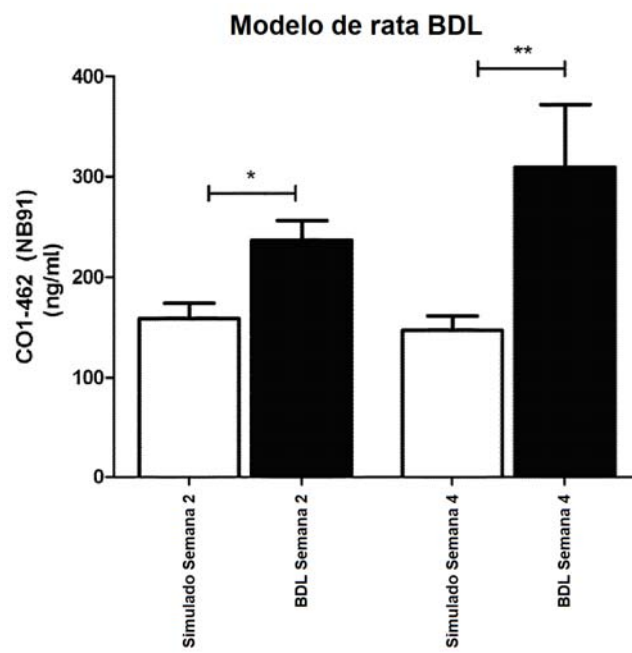


Figura 8

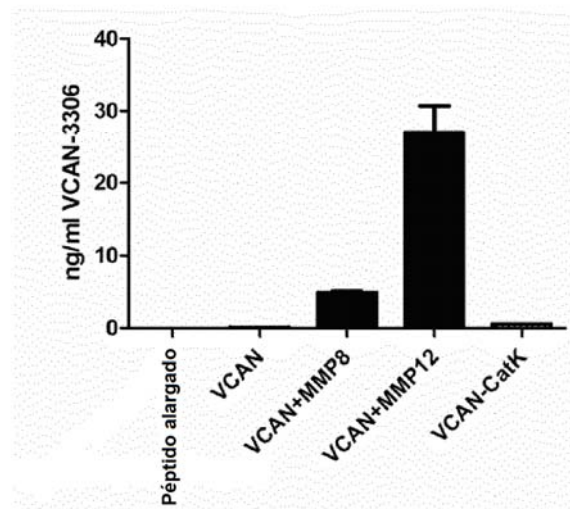


Figura 9

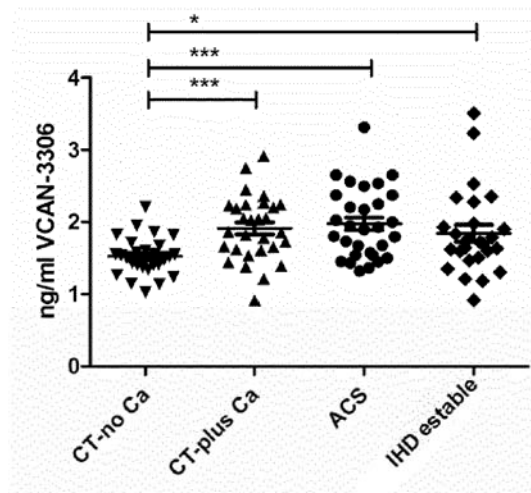


Figura 10

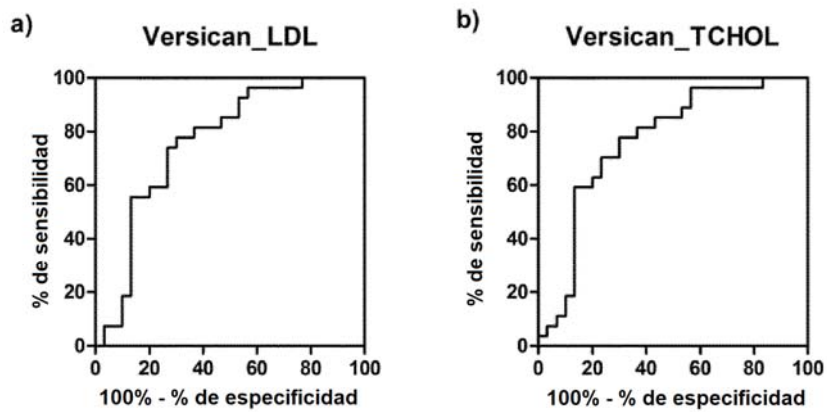


Figura 11

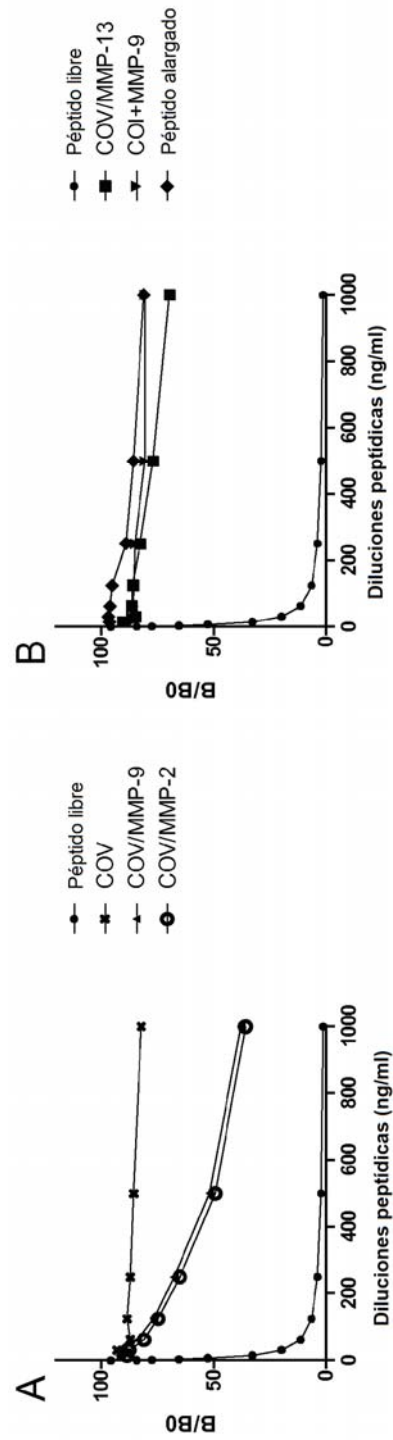


Figura 12

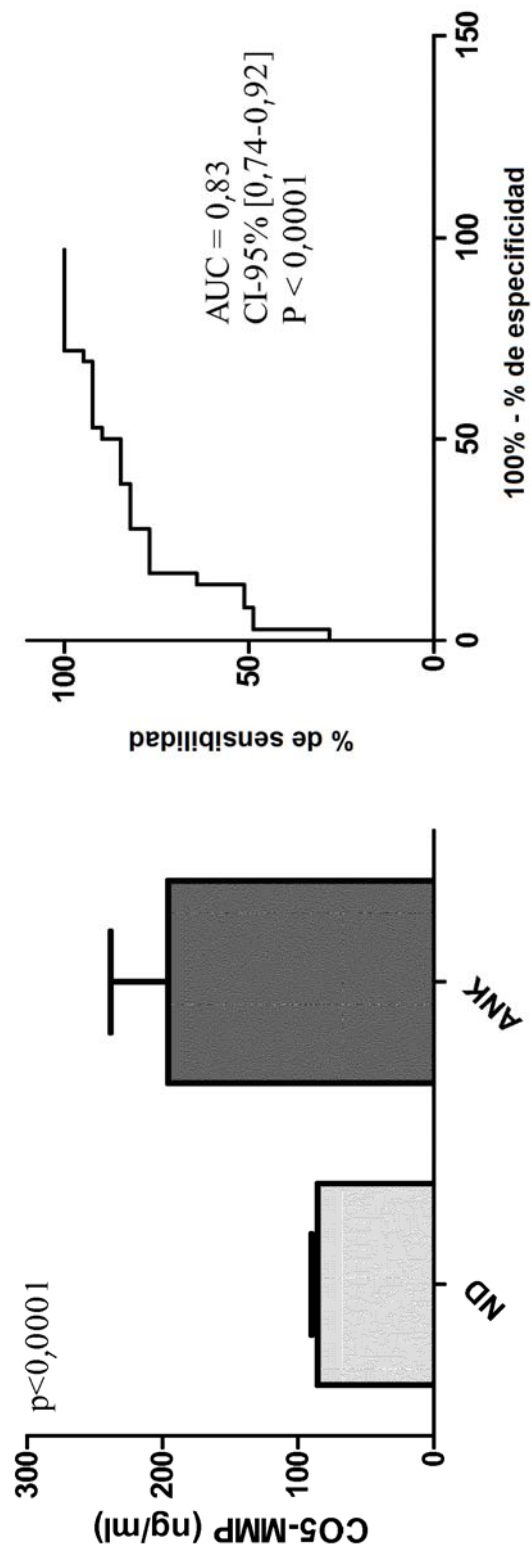


Figura 13