

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 629**

21 Número de solicitud: 202130777

51 Int. Cl.:

C07K 14/51 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.08.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2023

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
LA PRINCESA (100.0%)
C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta
28006 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARAÑÓN BARNUSELL, Patricia;
NARROS FERNÁNDEZ, Paloma;
REY FERNÁNDEZ, Esther;
GARCÍA MONZÓN, Carmelo;
EGEA MÁIQUEZ, Javier y
GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Águeda**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN TEMPRANO DE DAÑO HEPÁTICO MEDIANTE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 2 (BMP2) EN BIOPSIA LÍQUIDA**

57 Resumen:

Método de detección temprano de daño hepático mediante la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) en biopsia líquida.

Esta invención se refiere a un método de detección temprana de daño hepático, mediante la detección del producto de expresión de BMP2 en una biopsia líquida, seleccionada entre: saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero). Esta detección de daño hepático implica establecer la significación estadística de la concentración del producto de expresión del biomarcador. Por último, esta invención incluye el uso de un dispositivo para determinar el producto de expresión de BMP2, utilizado como biomarcador.

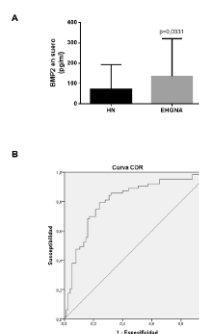


FIGURA 1

ES 2 933 629 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE DETECCIÓN TEMPRANO DE DAÑO HEPÁTICO MEDIANTE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 2 (BMP2) EN BIOPSIA LÍQUIDA

5 OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención comprende el uso de biomarcadores, combinaciones de biomarcadores, métodos de cribado y dispositivos de análisis para el seguimiento de la respuesta a tratamiento, el diagnóstico y la prognosis de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas.

- 10 En este sentido, la invención se refiere al uso de biomarcadores para la detección temprana de daño hepático utilizando la proteína BMP2, asociado a enfermedades hepáticas crónicas, como la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la hepatopatía alcohólica y las enfermedades colestásicas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (en inglés, Bone Morphogenetic Proteins, BMP) forman un amplio grupo de factores de crecimiento secretados altamente conservados. Originalmente fueron identificadas como factores de crecimiento y diferenciación de células osteogénicas. Sin embargo, en estudios posteriores se ha demostrado que ejercen efectos
- 20 pleiotrópicos en varios tejidos regulando diferentes procesos fisiológicos de la homeostasis celular, considerándose polipéptidos multifuncionales con un rango de acción mucho más amplio. Las proteínas BMP siguen participando durante el estado adulto en la homeostasis de un gran número de órganos y tejidos. De hecho, a día de hoy, más de 20 BMP humanas han sido identificadas y se han ido agrupando en subfamilias, basándose en su semejanza
- 25 estructural y en funciones conocidas que ejercen [1, 2].

- Las proteínas BMP juegan un papel fundamental para el correcto desarrollo y la homeostasis de un gran número de órganos y sistemas en la fase embrionaria y post-natal. Por ello un gran número de patologías de origen variable han sido asociadas a defectos en sus vías de señalización. Además de desórdenes que afectan al hueso (ej: fibrodisplasia
- 30 osificante progresiva) y articulaciones (ej: artritis reumatoide y osteoartritis), las proteínas BMP también participan en enfermedades no relacionadas con el esqueleto, incluyendo la esclerosis múltiple, inflamación de las vías respiratorias y enfermedades vasculares [3-6]. Igualmente, algunos componentes de la familia BMP, como sus receptores, han sido

relacionados con la predisposición a determinados tipos de cáncer [7]. Asimismo, las proteínas BMP también están implicadas en la progresión de la fibrosis renal [8]. Recientemente, se ha demostrado que algunas proteínas BMP están implicadas en la función del tejido adiposo, regulando procesos adipogénicos y termogénicos [9]. Sin embargo, la implicación de estos factores de crecimiento en patologías hepáticas apenas ha sido estudiada.

Las enfermedades hepáticas aparecen cuando el hígado ha sufrido daño durante largos periodos de tiempo. Esto da lugar a la formación de un tejido cicatrizante (fibrosis) con el objetivo de reparar el daño, pero que limita la capacidad funcional del hígado. Cabe destacar que previo a la formación de fibrosis tiene lugar un proceso inflamatorio con el fin de compensar y resolver el daño producido. Cuando los procesos fibróticos se mantienen en el tiempo, se van haciendo más graves y pueden causar lesiones hepáticas. En la clínica, el estadio de la fibrosis se evalúa siguiendo una escala de F0 a F4, donde F0 es el estadio más leve, sin fibrosis, y F4 el más severo, denominado cirrosis.

Existen diferentes causas por las que se genera un daño crónico en el hígado incluyendo las hepatitis víricas, las enfermedades autoinmunes, enfermedades colestásicas o el consumo abusivo de algunos medicamentos, drogas o alcohol. Sin embargo, la principal enfermedad hepática crónica en el mundo occidental es la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA). Esta enfermedad se considera la expresión hepática del síndrome metabólico, y por tanto se asocia con obesidad, dislipemia, diabetes e hipertensión arterial que son las principales características de este síndrome. Mientras que la mayoría de los pacientes con EHGNA presentan la enfermedad de manera asintomática con un simple depósito de grasa en el hepatocito (esteatosis, ESNA), el 20% de los individuos acaban desarrollando inflamación hepática crónica o esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con estadios variables de fibrosis concomitante que a su vez puede conducir hacia estados más graves de enfermedad hepática como cirrosis, hipertensión portal e incluso carcinoma hepatocelular [10].

Los síntomas de enfermedad hepática son muy variados y entre ellos se incluyen la hinchazón del abdomen y las piernas, los cambios en el color de las heces y la ictericia. Puesto que la enfermedad hepática es asintomática en sus estadios iniciales, el diagnóstico de la misma suele ser tardío lo cual tiene como consecuencia un peor pronóstico. Por ello, un diagnóstico y tratamiento temprano son de gran importancia para prevenir la progresión de la enfermedad a estadios más avanzados.

En este sentido, la búsqueda de biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano y no invasivo de la enfermedad hepática está siendo clave en el desarrollo de nuevas

herramientas diagnósticas, ya que, tradicionalmente, la biopsia hepática es la única forma de confirmar el diagnóstico de lesión hepática. Esta técnica permite determinar la gravedad, el daño estructural (inflamación, necrosis, fibrosis) y proporcionar información sobre el pronóstico de la enfermedad. El problema es que al ser un método invasivo no exento de riesgos para el paciente, la búsqueda de marcadores eficaces y no invasivos es crucial para el diagnóstico de las diferentes fases de enfermedades hepáticas

El papel de las proteínas BMP en las enfermedades hepáticas apenas ha sido investigado. En concreto, se ha demostrado que la proteína BMP2 ejerce un papel importante, junto a BMP6, en el control de la homeostasis del hierro regulando la expresión hepática de hepcidina [11]. Asimismo, se ha estudiado el mecanismo del alcohol como inductor de lesiones hepáticas a través de BMP2 en modelos murinos con hígado graso alcohólico [12]. Otro estudio reflejó que BMP2 tiene efectos antifibrogénicos, ya que bloquea la activación de las células estelares hepáticas, fundamentales en el desarrollo de fibrosis [13]. Por último, BMP2 también se ha asociado al crecimiento y a la capacidad angiogénica, de migración e invasión de células tumorales hepáticas [14-16].

Los biomarcadores, moléculas (péptidos, proteínas, fragmentos de material genético) presentes en diferentes fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas o saliva) derivados de la afectación tisular, pueden ser utilizados para establecer la gravedad y la evolución de las lesiones en diferentes órganos y patologías. Sin embargo, su uso en la determinación del daño hepático es relativamente reciente. No hay todavía constancia de su uso para establecer el estadio de la lesión hepática.

Por todo ello, el objeto de esta invención es un método de detección temprano y no invasivo basado en biopsia líquida de la proteína BMP2 en estadios iniciales para mejorar el manejo y evolución de los pacientes con daño hepático crónico.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los siguientes términos de la invención se definen a continuación de forma detallada.

El término “lesión hepática o daño hepático” tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una afectación del hígado que produzca remodelación y/o destrucción celular o tisular en enfermedades hepática y está causado por la enfermedad del hígado graso no alcohólico, las enfermedades colestásicas y el hígado graso alcohólico.

“Gravedad” o “extensión” o “magnitud” de la lesión son términos que se usan indistintamente.

“Ensayo” se refiere a cualquier método generalmente conocido en la técnica para detectar una lesión hepática o cualquier otro método estándar para la detección de biomarcadores.

“Muestra” o “muestra biológica” se refiere a cualquier fluido, seleccionado entre: saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero), preferentemente sangre, y más preferentemente plasma o suero sanguíneo.

“Muestra biológica” y “biopsia líquida” son sinónimos y se emplean indistintamente en la presente memoria.

“Biomarcador” o “marcador” se refiere a cualquier proteína o marcador de utilidad para detectar en una muestra biológica líquida, el daño o lesión hepática.

- 10 El término “BMP2” como se utiliza en esta memoria se refiere a la proteína Morfogenética Ósea 2 (número UniProtKB P12643).

La expresión “detección temprana” tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la detección de la enfermedad hepática antes de estadios finales de la enfermedad hepática crónica como son la cirrosis y el hepatocarcinoma.

- 15 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable.

El término "cantidad" tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere, pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de las proteínas, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos, ya sea por medida directa o indirecta.

- 20 El término "comparación", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere, pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de las proteínas de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de las proteínas de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema manualmente o asistida por ordenador.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a animales, preferentemente mamíferos, y más preferentemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

- 30 En la presente memoria el término “soporte sólido” se refiere a todos los tipos de inmunoensayo, ya sean realizados sobre una superficie, por ejemplo, de vidrio, o una nanopartícula recubierta de anticuerpo.

El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos pueden ser inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo ELLA inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o chips de proteína.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a BMP2.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Cualquier otro término empleado en la presente memoria tendrá el significado habitual del sector de la técnica al que se refiere la presente invención.

La presente invención se refiere a un método de detección temprana de daño hepático en individuos que comprende:

- i. determinar el nivel de BMP2 en una biopsia líquida tomada de un individuo seleccionada entre: saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero),
- 20 y,
- ii. establecer la significación estadística de la comparación entre la combinación del nivel de los biomarcadores de 1 con la combinación del nivel de otros parámetros utilizados en la práctica habitual en la clínica de una muestra de referencia.

La lesión hepática o daño hepático, está causado por: la enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedades colestásicas y el hígado graso alcohólico.

En una realización preferida la causa del daño hepático es la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

En una realización preferida del método de la invención, la biopsia líquida es una muestra biológica seleccionada entre saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero) preferentemente sangre, y más preferentemente plasma o suero sanguíneo.

La significación estadística que implique la detección temprana de daño hepático se determina en base al resultado de la concentración del nivel de los biomarcadores. Para

obtener una determinación altamente precisa, la determinación se llevará a cabo después de comparar el nivel obtenido de los biomarcadores con el valor detectado con un nivel de referencia. El nivel de los biomarcadores de referencia puede ser obtenido a partir de una muestra biológica de un individuo sano.

- 5 En una realización preferida adicional del método de la invención, el establecimiento de la significación estadística del nivel del biomarcador y su comparación con una concentración de referencia, o ambos, pueden ser total o parcialmente automatizados sin depender del juicio de un especialista, como un médico o un técnico de laboratorio.

10 La detección del nivel de los biomarcadores puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

En una realización particular, la detección se realiza mediante un inmunoensayo.

15 En una realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo después ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

20 En otra realización preferente, el método de la invención supone disponer la muestra biológica del paciente en contacto con un dispositivo de estado sólido que contiene un sustrato con una superficie activada en la que se inmoviliza, en áreas discretas de dicha superficie, uno o más anticuerpos específicos para BMP2.

25 Los niveles de referencia pueden ser determinadas por cualquier método conocido en el estado de la técnica a partir de una muestra biológica de referencia. Estas pueden ser analizadas simultánea o consecutivamente, junto a la muestra biológica del individuo problema.

30 Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por cualquier medio conocido en el estado de la técnica a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo, pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas de BMP2 por cualquier medio conocido en el estado de la técnica en muestras de individuos sanos.

Una realización preferida de la presente invención, comprende además llevar a cabo una metodología estadística con cada uno de los valores del nivel de un biomarcador y producir

un valor de salida con significación estadística que indica si el individuo tiene daño hepático temprano.

La significación estadística se obtiene mediante la comparación del nivel de un biomarcador de la muestra biológica del sujeto con la muestra biológica de referencia
5 empleando una metodología estadística.

La metodología estadística se puede seleccionar entre: una prueba estadística paramétrica, como la prueba T de Student (t-test), una prueba estadística no paramétrica como la Prueba U de Mann-Whitney y un algoritmo clasificador del grupo. Este último comprende: un clasificador de árbol de decisión, clasificador de regresión logística,
10 clasificador de vecino más cercano, clasificador de red neuronal, modelo de mezcla gaussiano (GMM), Máquina de Vector de Soporte (SVM) clasificador, clasificador de centroide más cercano, clasificador de regresión lineal, clasificador lineal de análisis discriminante (LOA), clasificador de análisis discriminante cuadrático (QDA) y clasificador de bosque aleatorio y combinaciones de los anteriores.

15 El rendimiento de los resultados de los métodos estadísticos aplicados utilizados de acuerdo con la presente invención se puede describir mejor por sus características de funcionamiento del receptor (ROC). La curva ROC aborda tanto la sensibilidad (el número de verdaderos positivos) como la especificidad (número de verdaderos negativos) del ensayo. Por lo tanto, los valores de sensibilidad y especificidad para los biomarcadores de
20 la invención son una indicación del rendimiento del ensayo.

En otra realización preferida del método de la invención, la edad del individuo es mayor o igual a 20 años, preferentemente igual o mayor a 30 años, más preferentemente mayor de 45 años.

En otra realización preferida del método de la invención, el individuo presenta un estadio
25 de fibrosis hepática F0.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para cuantificar el nivel de BMP2.

En una realización preferida, el kit de la presente invención comprende los anticuerpos anti-BMP2. Preferentemente, el dispositivo de la invención comprende al menos un anticuerpo
30 anti-BMP2.

El dispositivo puede ser un inmunoensayo seleccionado entre: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo ELLA, inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map. o chips de proteína

En una realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene un reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

En otra realización preferida, el dispositivo de la invención comprende anticuerpos secundarios, controles positivos y negativos. El dispositivo además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación e inhibidores de la degradación de las proteínas.

El kit puede comprender soporte sólido o chip de proteínas, que comprende anticuerpos anti-BMP2.

Por otro lado, el dispositivo puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferentemente, el dispositivo comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Los autores de la presente invención han demostrado que la detección del nivel de proteínas BMP2 de manera cuantitativa de forma no invasiva permite detectar de manera temprana el daño hepático.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

Figura 1. A. Muestra los niveles en suero de BMP2 en sujetos con hígado normal y pacientes con EHGNA. **B.** Curva ROC con respecto a la discriminación de diagnóstico de EHGNA. El eje de abscisas está representado como 1- valor de especificidad.

Figura 2. A. Muestra los niveles en suero de BMP2 en sujetos con hígado normal y pacientes con esteatosis simple (ESNA). **B.** Curva ROC con respecto a la discriminación de diagnóstico de ESNA. El eje de abscisas está representado como 1- valor de especificidad.

Figura 3. A. Muestra los niveles en suero de BMP2 en sujetos con hígado normal y pacientes con ESNA grado 1 (G1 ESNA). **B.** Curva ROC con respecto a la discriminación de diagnóstico de ESNA grado 1 (G1 ESNA). El eje de abscisas está representado como 1- valor de especificidad.

DESCRIPCIÓN DE UN MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

El siguiente ejemplo ilustra la realización preferida de la invención, pero no debe interpretarse como limitativa o restrictiva de la presente invención.

Análisis de los niveles de la proteína BMP2 en muestras de pacientes con EHGNA

5 Un ejemplo en el que la invención es de utilidad es en pacientes con diferentes estadios de EHGNA. Los pacientes con EHGNA pueden servir como patología ejemplar en donde la invención es aplicable.

Los autores de la presente invención han analizado la expresión de BMP2 en individuos sanos y en individuos con EHGNA. Han encontrado una serie de biomarcadores que les
10 permiten la detección temprana del daño hepático. Así, la presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para la detección temprana de daño hepático en individuos con EHGNA.

Procedimientos experimentales

DISEÑO DEL ESTUDIO

15 Se ha partido de un estudio transversal retrospectivo en el que se incluyeron las muestras biológicas (biopsia hepática y suero) pertenecientes a la colección de muestras (número de referencia C.0002717) cuyo responsable es el Dr. Carmelo García Monzón del Hospital Universitario Santa Cristina. Las muestras biológicas de los pacientes se obtuvieron tras la firma de un consentimiento informado específico aprobado por el Comité Ético de
20 Investigación Clínica institucional. Esta cohorte de pacientes con EHGNA ha sido validada y acreditada [17].

1. Sujetos del estudio

Los 141 pacientes incluidos en el estudio acudieron al Hospital Universitario Santa Cristina para la realización de una colecistectomía laparoscópica programada y accedieron,
25 mediante la firma de un consentimiento informado por escrito, a que se les practicara una biopsia hepática percutánea durante la intervención quirúrgica.

Criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 75 años.
- Ausencia de un consumo significativo de alcohol (hombres < 20 gramos al día y mujeres
30 < 10 gramos al día), según la evaluación de un detallado cuestionario a los pacientes y familiares.

- Signos histológicos de esteatosis simple o esteatohepatitis según criterios internacionalmente aceptados [18]. Se incluyen también pacientes que mostraban una biopsia hepática histológicamente normal, los cuales se considerarán como grupo control.
- Firma previa de un consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica institucional.

De todos ellos se registraron diferentes variables demográficas (edad, sexo y raza) y antropométricas (talla, peso, índice de masa corporal, y perímetro de cintura y cadera).

2. Variables de estudio en las biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA en el citado estudio

Análisis de variables histológicas.

Parte del tejido hepático obtenido de la biopsia se fijó e incluyó en parafina para su estudio histológico mediante una tinción de hematoxilina-eosina y una tinción con tricómico de Masson. Secciones de biopsias teñidas con hematoxilina-eosina y tricómico de Masson fueron evaluadas por un único patólogo experto en histopatología hepática teniendo en cuenta los criterios publicados por Kleiner y col. [18]. De esta manera, se determinó el diagnóstico histológico de cada biopsia hepática. Los pacientes se han dividido en dos grupos: hígado normal y EHGNA. Sin embargo, ninguno de ellos mostró fibrosis hepática tras el análisis histológico; es decir, todos los pacientes presentaron un estadio de fibrosis F0.

3. Variables de estudio en el suero de pacientes con EHGNA en el citado estudio

Todas las variables bioquímicas se determinaron en muestras de suero almacenadas a -80° C procedentes de la sangre recogida en ayunas en el momento de la biopsia hepática que se realizó a todos los pacientes de estudio.

Determinación de variables bioquímicas.

Se determinaron los niveles de glucosa, creatinina, insulina, colesterol (LDL, HDL y VLDL), triglicéridos y enzimas hepáticas. Asimismo, se calculó el índice de resistencia a la insulina utilizando el modelo homeostático HOMA ($HOMA-IR = \text{insulina (mU/ml)} \times \text{glucosa (mmol/L)} / 22.5$).

A continuación, la Tabla 1 muestra los datos demográficos, metabólicos, bioquímicos e histopatológicos de la cohorte de estudio.

	HN (n=75)	EHGNA (n=65)
Edad (años)	46.58 ± 14.11	52.04 ± 13.49
Índice de masa corporal (IMC, kg/m ²)	27.57 ± 5.09	30.1 ± 6.2
Glucosa (mg/dL)	92.6 ± 19.46	101.83 ± 26.22
Insulina (μU/L)	7.67 ± 4.44	11.57 ± 8.2
HOMA-IR	1.83 ± 1.31	2.83 ± 2.01
Colesterol total (mg/dL)	191.17 ± 38.47	201.65 ± 38.94
Triglicéridos (mg/dL)	122.33 ± 66.78	142.2 ± 59.1
ALT (IU/L)	18.52 ± 10.08	29.48 ± 19.1
AST (IU/L)	17.96 ± 5.69	23.15 ± 11.35
γ-GT (IU/L)	32.36 ± 29.5	47.69 ± 49.33
Esteatosis (%)		
Grado 0	100%	
Grado 1		66.1%
Grado 2		23.1%
Grado 3		10.8%
Balloning e inflamación lobular (%)		
Grado 0	100%	84.6%
Grado 1		15.4%
Grado 2		
Grado 3		

Tabla 1: Características de los pacientes del estudio

Los datos están expresados como la media ± desviación estándar o como número de casos (%). Abreviaturas: HN, hígado normal; EHGNA, pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; γ-GT, gamma-glutamilttransferasa.

Determinación de los niveles de las proteínas BMP.

Los autores de la presente invención han determinado los niveles proteicos de BMP2 en individuos sanos y en individuos con EHGNA. Para la detección y cuantificación de BMP2 soluble en las muestras de suero de los pacientes incluidos en el estudio, se realizaron

inmunoensayos ELISA (Cusabio) específicos para BMP2 (CSB-E04507h). Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los reactivos estaban a temperatura ambiente media hora antes de ser usados y los viales con reactivos liofilizados fueron centrifugados antes de su reconstitución.

- 5 Tanto el anticuerpo conjugado con biotina como la solución de avidina y peroxidasa requirieron una dilución 1:100 para obtener una concentración final de uso (1X). Para ello se preparó un volumen final de 11 ml de cada reactivo diluyendo 110 µl de los mismos en sus correspondientes diluyentes. Para la solución de lavado cuyo stock tenía una concentración 25X, se diluyeron 80 ml en un volumen final de 2 litros de agua destilada.
- 10 Para la preparación del patrón, el vial se centrifugó a 9183 g durante 30 segundos antes de ser reconstituido con 1ml de diluyente de muestra. Así se obtuvo la solución stock de la cual se hicieron siete diluciones 1:2 sucesivas. Como blanco se usó el diluyente de muestra. Las concentraciones de las diluciones se encuentran descritas en la tabla 2 en unidades de pg/ml.

15

pg/ml	Stock	7	6	5	4	3	2	1	Blanco
BMP2	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	0

Tabla 2: Esquema de la distribución de las diluciones de BMP2 en el kit

- En cada ensayo, se utilizó una placa de 96 pocillos y se usaron 100 µl de patrón y 50 µl de muestra por pocillo. Se incubó la placa durante dos horas a 37°C y cubierta con una lámina adhesiva. Pasado el tiempo de incubación, se retiró todo el líquido de los pocillos y sin lavarlos se añadieron 100 µl a cada pocillo de la solución de anticuerpo anti-BMP2 conjugado con biotina. Se incubó a 37°C durante una hora, con la placa cubierta con una lámina adhesiva. A continuación, se realizaron dos lavados. Cada lavado consta de los siguientes pasos: aspiración de los pocillos, lavado con 200 µl de solución de lavado, reposo de 2 minutos y aspiración de la solución de lavado. Tras el último lavado se debe retirar totalmente el líquido remanente. Una vez realizados los lavados, se añadieron 100 µl por pocillo de la solución de avidina-peroxidasa y se incubó a 37°C durante una hora cubriendo la placa con una lámina adhesiva. Posteriormente se realizaron cinco lavados, se añadieron 90 µl de la solución con el sustrato y se incubó durante 30 minutos a 37°C protegido de la luz.
- 20
- 25
- 30 Iniciada la reacción y detectada mediante colorimetría, se añadieron 50 µl por pocillo de la solución de detención de reacción y se agitó suavemente la parte inferior de la placa para

facilitar el correcto mezclado de ambas soluciones. Finalmente, se midió la intensidad de color con el espectrofotómetro (DYNEX Spectra MR) a una longitud de onda de 450nm con una corrección de 540nm.

Análisis estadístico

- 5 Para obtener los valores cuantitativos de BMP2 de las muestras de suero de los pacientes mediante la técnica de ELISA, las absorbancias de las muestras se extrapolaron de una curva patrón realizada en paralelo (ajustada mediante una curva logística de 4 parámetros, 4PL). Una vez obtenidas las concentraciones del biomarcador BMP2 en suero, se realizó un test de normalidad (D'Agostino-Pearson). Las variables categóricas se presentan como
- 10 porcentajes y las variables continuas se muestran como media \pm desviación estándar si se distribuyen normalmente o como mediana (rango intercuartílico) si no se distribuyen normalmente. La significación para las diferencias intergrupales se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney para variables continuas. Se utilizaron análisis de regresión logística para confeccionar modelos explicativos sobre el papel de los biomarcadores ante
- 15 determinados parámetros clínicos. El valor pronóstico de los niveles de los biomarcadores a los distintos tiempos tras el ingreso hospitalario se evaluó mediante las curvas de Características Operativas del Receptor (ROC).

Resultados

- 20 Se midieron los niveles de BMP2 en sueros de sujetos con hígado normal (HN) (n=75) y de pacientes con EHGNA (n=65).

Los niveles de BMP2 en suero de pacientes con EHGNA aumentaron significativamente en comparación con individuos sanos, según su diagnóstico histológico ($p=0.0331$). Los datos están expresados como pg/ml, y están representados como mediana (rango intercuartílico, RIQ) (Figura 1A):

25

Valor de la mediana de BMP2 en suero (pg/ml): HN = 72,45 (RIQ = 51,44 - 121,2); EHGNA = 136.1 (RIQ = 95,71 - 202,5).

A continuación, los valores de BMP2 se clasificaron entre aquellos por debajo de la mediana de los valores de BMP2 de la toda la cohorte asignándoles un valor de 0 y aquellos por encima de la mediana a los que se les asignó un valor de 1, siendo la mediana de la

30 cohorte 96.84 (pg/ml de BMP2 circulante).

Se realizó un análisis univariante para la predicción de presencia de EHGNA como variable dependiente y BMP2 clasificado en función de la mediana como variable independiente. El

resultado mostró que la variable BMP2 tiene una significancia de $p=0,012$ en este modelo, con un Odds ratio (OR) de 2,4 (IC 95%: 1,215 - 4,740).

Asimismo, se diseñó un modelo predictivo de regresión logística multivariante en el que se combinó la concentración de BMP2 en suero (clasificada en función de la mediana) con otros parámetros utilizados en la práctica habitual en la clínica (edad, sexo, diabetes, colesterol total, etc.) como variables independientes. En este modelo, la variable BMP2 es significativa estadísticamente ($p=0,011$) con un OR igual a 2,899 (IC 95%: 1,281 - 6,563). La probabilidad pronóstica de este modelo de regresión logística presenta una curva ROC con un área bajo la curva de 0,809 (IC 95%: 0,735 - 0,884) (Figura 1B). Además, se desarrolló una fórmula específica para la aplicación clínica del modelo predictivo. El cálculo de la probabilidad de que un paciente tenga un diagnóstico de EHGNA se ajusta a la siguiente ecuación:

probabilidad de EHGNA = $1 / (1 + \exp (-7.013 + 1.064 (\text{Mediana BMP2}) + 1.009 (\text{Sexo}) + 0.030 (\text{Edad}) + 1.619 (\text{IMC } 25-30) + 1.302 (\text{IMC} > 30) + 1.368 (\text{Diabetes}) + 0.004 (\text{Glucosa}) + 0.014 (\text{Colesterol total}) + 0.005 \gamma\text{-GT}),$

donde los parámetros se sustituyen en función de:

- Mediana BMP2: 0, BMP2 en suero < 96.84 pg/ml, y 1, BMP2 en suero > 96.84 pg/ml.
- Sexo: 0, sexo femenino y 1, sexo masculino.
- Edad: valor en años.
- IMC 25-30: 0, IMC < 25, y 1, IMC 25-30.
- IMC > 30: 0, IMC < 30, y 1, IMC > 30.
- Diabetes: 0, diabetes no y 1, diabetes sí.
- Glucosa: valor en mg/dl
- Colesterol total: valor en mg/dl
- γ -GT: valor en UI/L

A continuación, se analizó la diferencia entre los niveles de BMP2 en muestras de suero de sujetos con hígado normal (HN) ($n=75$) y de pacientes con esteatosis simple (ESNA) ($n=56$), el primer estadio de la EHGNA.

Los niveles de BMP2 aumentaron en el suero de pacientes con ESNA respecto a los sujetos con hígado normal según su diagnóstico histológico ($p=0.0552$). Los datos están expresados como pg/ml, y están representados como mediana (rango intercuartílico, RIQ) (Figura 2A):

Valor medio de BMP2 en suero (pg/ml): HN = 72,45 (RIQ = 51,44 - 121,2); ESNA = 134.4 (RIQ = 95.69 - 202,5).

A continuación, los valores de BMP2 se clasificaron entre aquellos por debajo de la mediana de los valores de BMP2 de la cohorte asignándoles un valor de 0 y aquellos por encima de la mediana a los que se les asignó un valor de 1, siendo la mediana de la cohorte 95.69 (pg/ml de BMP2 circulante).

Se realizó un análisis univariante para la predicción de presencia de EHGNA como variable dependiente y BMP2 clasificado en función de la mediana como variable independiente. El resultado mostró que la variable BMP2 tiene una significancia de $p=0,007$ en este modelo, con un Odds ratio (OR) de 2,7 (IC 95%: 1,320 - 5,523).

Asimismo, se diseñó un modelo predictivo de regresión logística multivariante en el que se combinó la concentración de BMP2 en suero (clasificada en función de la mediana) con otros parámetros utilizados en la práctica habitual en la clínica (edad, sexo, diabetes, colesterol total, etc.) como variables independientes. En este modelo, la variable BMP2 es estadísticamente significativa ($p=0,005$) con un OR igual a 3,428 (IC 95%: 1,455 – 8.076). La probabilidad pronóstica de este modelo de regresión logística presenta una curva ROC con un área bajo la curva de 0,802 (IC 95%: 0,724 - 0,881) (Figura 2B). Por último, se desarrolló una fórmula específica para la aplicación clínica del modelo predictivo. El cálculo de la probabilidad de que un paciente tenga un diagnóstico de ESNA se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\text{probabilidad de ESNA} = 1 / (1 + \exp (-7.429 + 1.232 (\text{Mediana BMP2}) + 0.812 (\text{Sexo}) + 0.032 (\text{Edad}) + 1.662 (\text{IMC 25-30}) + 1.132 (\text{IMC}>30) + 0.894 (\text{Diabetes}) + 0.007 (\text{Glucosa}) + 0.015 (\text{Colesterol total}) - 0.002 (\text{Triglicéridos}) + 0.006 \gamma\text{-GT}),$$

25

donde los parámetros se sustituyen en función de:

- Mediana BMP2: 0, BMP2 en suero < 95.69 pg/ml, y 1, BMP2 en suero > 95.69 pg/ml.
- Sexo: 0, sexo femenino y 1, sexo masculino.
- Edad: valor en años.
- IMC 25-30: 0, IMC < 25, y 1, IMC 25-30.
- IMC > 30: 0, IMC < 30, y 1, IMC > 30.
- Diabetes: 0, diabetes no y 1, diabetes sí.
- Glucosa: valor en mg/dl

30

- Colesterol total: valor en mg/dl
- Triglicéridos: valor en mg/dl
- γ -GT: valor en UI/L

Por último, se analizó la diferencia entre los niveles de BMP2 en sueros de sujetos con hígado normal (HN) (n=75) y de pacientes con grado 1 de esteatosis simple (G1 ESNA) (n=41), la lesión más temprana de la EHGNA.

Los niveles proteicos de BMP2 aumentaron en suero de pacientes con grado 1 de ESNA respecto a los sujetos con hígado normal según su diagnóstico histológico (p=0.0416). Los datos están expresados como pg/ml, y están representados como mediana (rango intercuartílico, RIQ) (Figura 3A):

Valor medio de BMP2 en suero (pg/ml): HN = 72,45 (RIQ = 51,44 - 121,2); EHGNA = 132,8 (RIQ = 95,69 - 202,5).

A continuación, los valores de BMP2 se clasificaron entre aquellos por debajo de la mediana de los valores de BMP2 de la cohorte asignándoles un valor de 0 y aquellos por encima de la mediana a los que se les asignó un valor de 1, siendo la mediana de la cohorte 94,24 (pg/ml de BMP2 circulante).

Se realizó un análisis univariante para la predicción de presencia de EHGNA como variable dependiente y BMP2 clasificado en función de la mediana como variable independiente. El resultado mostró que la variable BMP2 tiene una significancia de 0.004 en este modelo, con un Odds ratio (OR) de 3.231 (IC 95%: 1,446 - 7,218).

Asimismo, se diseñó un modelo predictivo de regresión logística multivariante en el que se combinó la concentración de BMP2 en suero (clasificada en función de la mediana) con otros parámetros utilizados en la práctica habitual en la clínica (edad, sexo, diabetes, colesterol total, etc.) como variables independientes. En este modelo, la variable BMP2 es estadísticamente significativa (p=0,002) con un OR igual a 4,624 (IC 95%: 1,720 - 12,427). La probabilidad pronóstica de este modelo de regresión logística presenta una curva ROC con un área bajo la curva de 0.812 (IC 95%: 0,724 - 0, 899) (Figura 3B). Además, desarrollamos una fórmula correspondiente para la aplicación clínica del modelo predictivo. Para ello, el cálculo de la probabilidad de que un paciente tenga un diagnóstico de grado 1 de ESNA se ajusta a la siguiente ecuación:

probabilidad de G1 ESNA = $1 / (1 + \exp (-6.964 + 1.531 (\text{Mediana BMP2}) + 0.687 (\text{Sexo}) + 0.037 (\text{Edad}) + 1.633 (\text{IMC } 25\text{-}30) + 0.573 (\text{IMC} > 30) + 0.015 (\text{Colesterol total}) - 0.112 (\text{AST}) + 0.083 (\text{ALT})))$, donde los parámetros se sustituyen en función de:

ES 2 933 629 A1

- Mediana BMP2: 0, BMP2 en suero < 94,24 pg/ml, y 1, BMP2 en suero > 94,24 pg/ml.
 - Sexo: 0, sexo femenino y 1, sexo masculino.
 - Edad: valor en años.
 - IMC 25-30: 0, IMC < 25, y 1, IMC 25-30.
- 5
- IMC > 30: 0, IMC < 30, y 1, IMC > 30.
 - Colesterol total: valor en mg/dl
 - AST: valor en UI/L
 - ALT: valor en UI/L

10

BIBLIOGRAFÍA

1. Carreira, A.C., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 64-73.
2. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
3. Morrell, N.W., et al., *Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(2): p. 106-20.
4. Rosendahl, A., et al., *Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(2): p. 160-9.
5. Salazar, V.S., L.W. Gamer, and V. Rosen, *BMP signalling in skeletal development, disease and repair*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(4): p. 203-21.
6. Voumvourakis, K.I., et al., *TGF-beta/BMPs: crucial crossroad in neural autoimmune disorders*. Neurochem Int, 2011. **59**(5): p. 542-50.
7. Singh, A. and R.J. Morris, *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(4): p. 299-313.
8. Munoz-Felix, J.M., et al., *TGF-beta/BMP proteins as therapeutic targets in renal fibrosis. Where have we arrived after 25 years of trials and tribulations?* Pharmacol Ther, 2015. **156**: p. 44-58.
9. Whittle, A.J., et al., *BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions*. Cell, 2012. **149**(4): p. 871-85.
10. Mundi, M.S., et al., *Evolution of NAFLD and Its Management*. Nutr Clin Pract, 2020. **35**(1): p. 72-84.
11. Wang, C.Y., et al., *Iron, erythropoietin, and inflammation regulate hepcidin in Bmp2-deficient mice, but serum iron fails to induce hepcidin in Bmp6-deficient mice*. Am J Hematol, 2019. **94**(2): p. 240-248.
12. Roeb, E., et al., *TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat*. J Hepatol, 1997. **27**(3): p. 535-44.
13. Chung, Y.H., et al., *BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF-beta1 signaling*. Lab Invest, 2018. **98**(8): p. 999-1013.
14. Wu, G., et al., *High Levels of BMP2 Promote Liver Cancer Growth via the Activation of Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 194.
15. Wu, J.B., et al., *Effects of siRNA-targeting BMP-2 on the abilities of migration and invasion of human liver cancer SMMC7721 cells and its mechanism*. Cancer Gene Ther, 2011. **18**(1): p. 20-5.

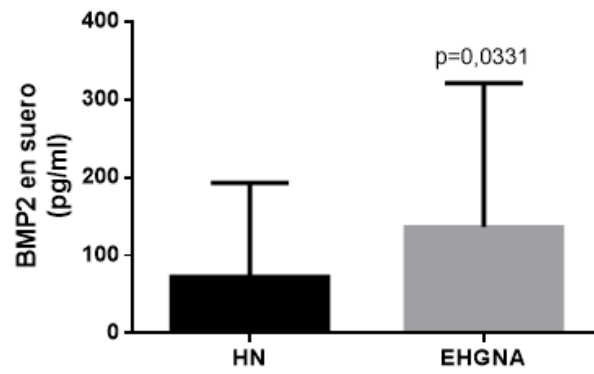
16. Zuo, W.H., et al., *Promotive effects of bone morphogenetic protein 2 on angiogenesis in hepatocarcinoma via multiple signal pathways*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37499.
- 5 17. Garcia-Monzon, C., et al., *Prevalence and risk factors for biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort of adult patients with gallstones*. Liver Int, 2015. **35**(8): p. 1983-91.
18. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección temprana de daño hepático en individuos, que comprende:
 - i. determinar el nivel de BMP2 en una biopsia líquida tomada de un individuo, pudiendo ser una muestra de: saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero) y,
 - ii. establecer la significación estadística de la comparación entre la combinación del nivel de los biomarcadores de 1) y la combinación del nivel de otros parámetros utilizados en la práctica clínica habitual de una muestra de referencia.
2. Método según la reivindicación anterior, en el que el daño hepático está causado por: la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), enfermedades colestásicas y el hígado graso alcohólico.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la biopsia líquida es una muestra biológica seleccionada entre saliva, lágrimas, orina y sangre (plasma o suero), preferentemente sangre, y más preferentemente plasma o suero sanguíneo.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de proteína de los biomarcadores de referencia se obtiene a partir de una muestra biológica de referencia, obtenida de un individuo sano.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la significación estadística se obtiene mediante la comparación del nivel de proteína de la muestra biológica del individuo con la muestra biológica de referencia empleando una metodología estadística.
6. Método según la reivindicación anterior, en el que la metodología estadística se selecciona entre: una prueba estadística paramétrica, una prueba estadística no paramétrica, un algoritmo clasificador y combinaciones de estos.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende clasificar a un individuo según el valor de al menos un marcador seleccionado entre: marcadores bioquímicos de daño hepático, índices de biomarcadores serológicos para la predicción de la lesión hepática, esteatosis hepática, de existencia de fibrosis significativa, y de identificación de distintos grados de fibrosis.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo es mayor o igual a 20 años, preferentemente igual o mayor a 30 años, más preferentemente más de 45 años.
- 5
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende poner la muestra biológica del individuo en contacto con un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada en la que se inmoviliza, en áreas discretas de dicha superficie activada, uno o más anticuerpos
- 10
- específicos para BMP2.
10. Uso de un dispositivo para la realización del método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende los elementos necesarios para detectar y cuantificar el nivel de proteína de BMP2.
- 15
11. Uso según la reivindicación anterior, en el que el dispositivo es un inmunoensayo seleccionado entre inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map. y chips de proteína
- 20
12. Uso según la reivindicación anterior, en el que el ELISA se selecciona entre ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA sándwich.
13. Uso según una de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el dispositivo comprende
- 25
- anticuerpos secundarios, controles positivos y negativos, tampones, soluciones de extracción de proteínas, y agentes para prevenir la contaminación e inhibidores de la degradación de las proteínas.
14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que el dispositivo
- 30
- comprende todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización, además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A



B

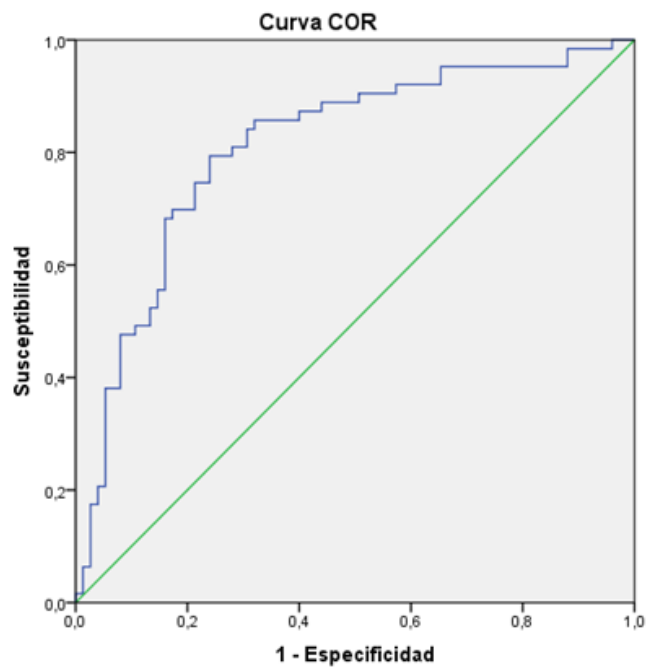
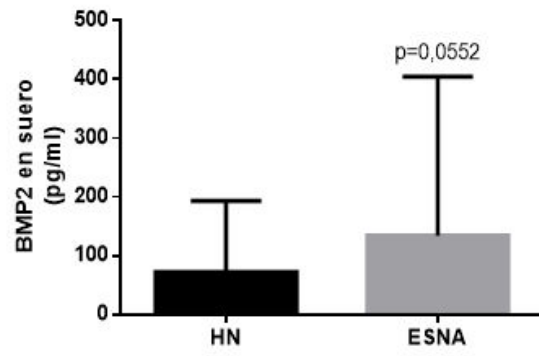


FIGURA 1

A



B

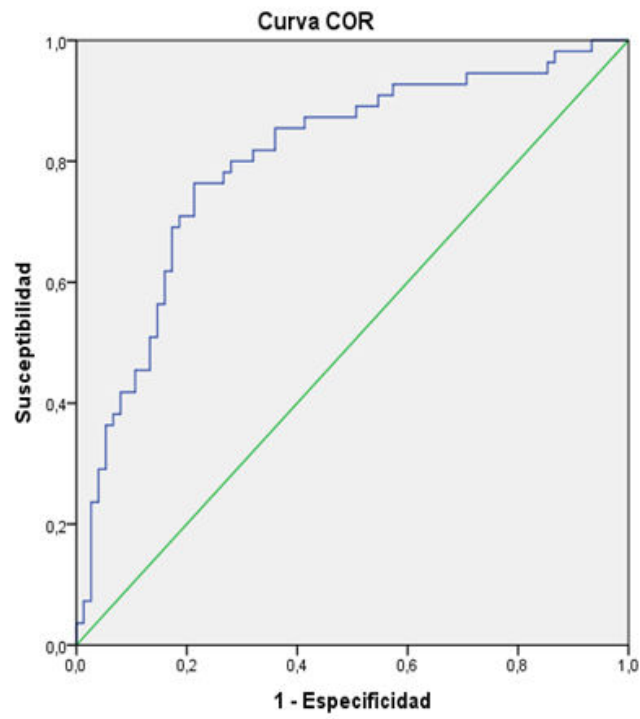
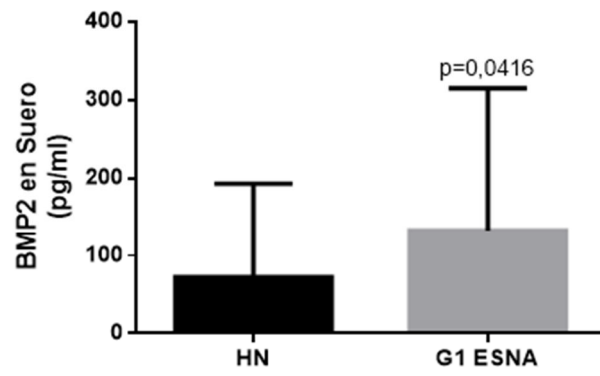


FIGURA 2

A



B

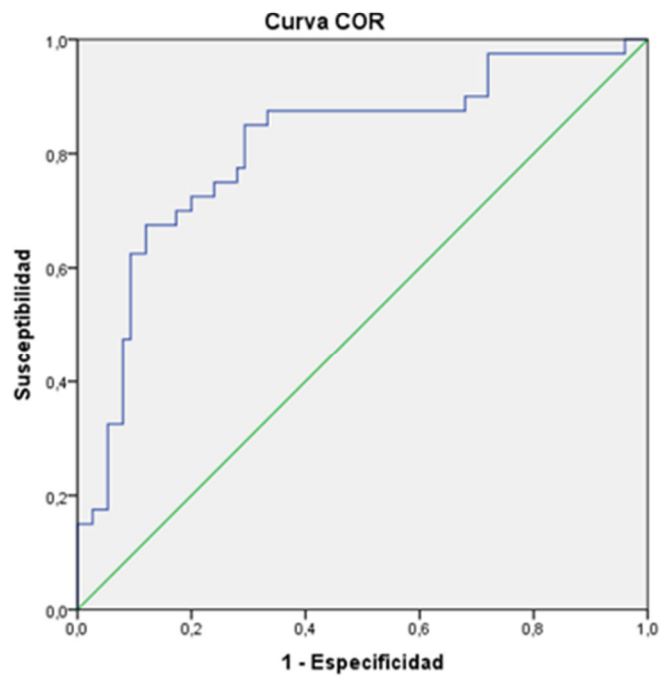


FIGURA 3



- ②① N.º solicitud: 202130777
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.08.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. ci.: **C07K14/51** (2006.01)
G01N33/74 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NAKATSUKA, R. et al. Transient expression of bone morphogenic protein-2 in acute liver injury by carbon tetrachloride. Journal of Biochemistry. Enero 2007, Vol. 141, Nº 1, páginas 113 - 119. ISSN 0021-924X (impreso), ISSN 1756-2651(electrónico), <DOI:10.1093/jb/mvm012>. Especialmente: páginas: 113, 115.	1-4, 8-14
X	GERJEVIC, L. N. et al. Alcohol activates TGF-beta but inhibits BMP receptor-mediated Smad signaling and Smad4 binding to hepcidin promoter in the liver. International Journal of Hepatology. 2012, Vol. 2012, Nº artículo 459278. ISSN 2090-3456 (electrónico), <DOI:10.1155/2012/459278>. Especialmente: página 4; página 6, primer párrafo; figura 1.	1-4, 8-14
X	ARNDT, E. et al. Enhanced expression of BMP6 inhibits hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Gut. Junio 2015, Vol. 64, Nº 6, páginas 973 - 981. ISSN 0017-5749, <DOI:10.1136/gutjnl-2014-306968>. Especialmente: página 975, columna derecha; página 978, columna derecha.	1-4, 8-14
A	TANG, Y. et al. Quercetin prevents ethanol-induced iron overload by regulating hepcidin through the BMP6/SMAD4 signaling pathway. The Journal of Nutritional Biochemistry. Junio 2014, Vol. 25, Nº 6, páginas 675 - 682. ISSN 0955-2863, <DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.02.009>. Especialmente: página 678; página 679, columna derecha; figura suplementaria.	1-4, 8-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-4, 8-14

Fecha de realización del informe
31.05.2022

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/3



- ②¹ N.º solicitud: 202130777
②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.08.2021
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. ci.: **C07K14/51** (2006.01)
G01N33/74 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OUMI, N. et al. A crucial role of bone morphogenetic protein signaling in the wound healing response in acute liver injury induced by carbon tetrachloride. International Journal of Hepatology. 2012, Vol. 2012, N° artículo 476820. ISSN 2090-3456 (electrónico), <DOI:10.1155/2012/476820>. Especialmente: página 1, primer párrafo; apartado 3.1; figura1.	1-4, 8-14
A	CASTERA, L. et al. Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology. Abril 2019, Vol. 156, N° 5, páginas 1264 - 1281. ISSN 0016-5085 (impreso), ISSN 1528-0012 (electrónico), <DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.036>. Especialmente: página 1266, columna izquierda, segundo párrafo.	1-4, 8-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-4, 8-14

Fecha de realización del informe
31.05.2022

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/3

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, DIALNET