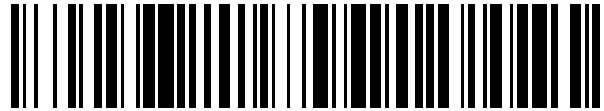


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 841**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 16/06** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2017 PCT/US2017/018040**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017 WO17146971**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2017 E 17757011 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022 EP 3419646**

54 Título: **Detección temprana de carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

**26.02.2016 US 201662300142 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2023**

73 Titular/es:

**DREXEL UNIVERSITY (100.0%)  
3141 Chestnut Street  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**BLOCK, TIMOTHY, M.;  
WANG, MENGJUN y  
MEHTA, ANAND**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 939 841 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

Detección temprana de carcinoma hepatocelular

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método de ensayo para la detección carcinoma hepatocelular en un sujeto.

## 10 ANTECEDENTES

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y/o el virus de la hepatitis C (VHC) es la principal etiología del cáncer hepatocelular (CHC). Tanto el VHB como el VHC provocan infecciones hepáticas agudas y crónicas y la mayoría de los individuos con infección crónica permanecen asintomáticas durante muchos años, ya que la enfermedad clínica (CHC y cirrosis) habitualmente tarda décadas en desarrollarse. Del diez al cuarenta por ciento de todos los portadores crónicos del VHB eventualmente desarrollan cáncer de hígado, y se estima que más de un millón de personas en todo el mundo mueren a causa del cáncer de hígado asociado al VHB/VHC. De hecho, las infecciones por VHB y VHC se asocian con más del 80% de todos los casos de CHC en todo el mundo y pueden llegar al 96% en regiones donde el VHB es endémico.

La progresión de la enfermedad hepática hacia el cáncer de hígado se monitoriza principalmente mediante el uso de niveles séricos de la glicoproteína oncofetal, alfa-fetoproteína (AFP) o la glicofoma fucosilada central de AFP (AFP-L3). Sin embargo, la AFP puede producirse en muchas circunstancias, incluyendo otras enfermedades hepáticas, como el hepatoma humano, el hepatoblastoma y la infección por hepatitis B, y no está presente en todas las personas con CHC. Por tanto, se ha cuestionado el uso de AFP como detección primaria para el CHC y hay una necesidad de biomarcadores séricos más sensibles para el CHC.

La glicosilación de proteínas puede ser específica de células, y el glicano N-enlazado que lleva una proteína es una modificación que se produce en la célula de la que procede. Las estructuras de azúcar (glicano) en una proteína secretada por tejido maligno o enfermo pueden diferir, y a menudo lo hacen, de los glicanos que están presentes en la misma proteína de las células normales. De hecho, numerosos estudios han observado cambios en la glicosilación N-enlazada con el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) (ver, por ejemplo, Naitoh, A., et al., Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 14: 436-445, 1999; Block, T. M., et al., Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 779-784, 2005). Por ejemplo, en individuos infectados de manera crónica con VHC y que tienen un diagnóstico de CHC, la cantidad de glicano N-enlazado fucosilado derivado de preparaciones de proteínas totales aisladas de suero fue consistentemente mayor que la de sujetos sanos o los que tienen VHC y enfermedad 'inactiva' (Comunale, M. A., et al., Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *Journal of Proteome Research*, 6: 308-315, 2006).

Sin embargo, todavía no ha sido posible identificar una única glicoproteína, patrón de glicosilación, conjunto de biomarcadores u otro indicador del CHC que confiera un alto grado de sensibilidad y capacidad para la detección temprana. Sigue habiendo una gran necesidad de detectores tempranos de CHC.

Wang et al., A comparison of statistical methods for the detection of hepatocellular carcinoma based on serum biomarkers and clinical variables, *BMC Medical Genomics* volumen 6, N° de artículo: S9 (2013), describe *"la utilidad de incorporar múltiples biomarcadores y variables clínicas relevantes en un modelo estadístico para predecir la incidencia del CHC"*.

## 50 SUMARIO

La invención se define de manera general en la reivindicación 1. Las realizaciones adicionales se exponen en las reivindicaciones dependientes.

En su sentido general, la presente invención proporciona un método de ensayo para detectar carcinoma hepatocelular en un sujeto que comprende:

medir la cantidad de una pluralidad de biomarcadores en un fluido biológico del sujeto, en donde el método de ensayo elimina proteínas de IgG e IgM del fluido biológico del sujeto antes de medir la cantidad de biomarcadores que son glicofomas que contienen fucosa; determinar la edad y el género del sujeto; y, determinar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular en el sujeto usando un resultado optimizado de una función de la edad y género determinado, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, en donde el fluido biológico es sangre completa, suero, o plasma y

en donde la pluralidad de biomarcadores comprenden: alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, y fosfatasa alcalina (ALK).

5 En una realización, la función comprende coeficientes de ponderación optimizados respectivos para la edad y género determinados, y para las cantidades medidas de la pluralidad de biomarcadores.

10 En una realización, la pluralidad de biomarcadores comprende además uno o más de fetuina-A fucosilada, hemopexina fucosilada, alfa-1-antitripsina fucosilada, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

En una realización, la pluralidad de biomarcadores comprende además aspartato aminotransferasa (AST).

En una realización, la pluralidad de biomarcadores son

- 15 (i) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK) y aspartato aminotransferasa (AST);  
 (ii) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y alfa-1-antitripsina fucosilada;  
 (iii) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y fetuina-A fucosilada; o  
 20 (iv) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST), fetuina-A fucosilada y alfa-1-antitripsina fucosilada.

25 En una realización, la pluralidad de biomarcadores son alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y alfa-1-antitripsina fucosilada.

En una realización, la pluralidad de biomarcadores son alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y fetuina-A fucosilada.

30 En una realización, el método de ensayo utiliza reactivos para eliminar las proteínas de IgG e IgM. En una realización, el reactivo que elimina IgG y el reactivo que elimina IgM son iguales. En una realización, el reactivo que elimina IgG es proteína A/G, y el reactivo que elimina IgM es un filtro basado en peso molecular. En una realización, la IgG y la IgM se eliminan incubando el fluido biológico con polietilenglicol.

35 En una realización, el carcinoma hepatocelular es carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína, o carcino hepatocelular en estadio temprano que también es carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína.

40 En una realización, el método de ensayo comprende además seleccionar un tratamiento en base al resultado optimizado de una función de la edad y el género detemrinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, en donde el tratamiento es para carcinoma hepatocelular cuando se determina que el sujeto tiene la enfermedad en base al resultado de la función.

45 Las identidades de los biomarcadores individuales que se miden de acuerdo con la presente divulgación son tanto específicas como críticas para la precisión de la detección del carcinoma hepatocelular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Las FIGS. 1A-1C representan los resultados de una evaluación de un panel que consiste en quinínogeno de bajo peso molecular fucosilado, alfa-fetoproteína, aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALK), edad y género. La FIG. 1A resume los datos AUROC para la discriminación de todos los pacientes con CHC (N=115) de todos los pacientes con cirrosis (N=93); con CHC en estadio temprano (N=69) por cirrosis (N=93); con AFP negativo (AFP; que tiene un nivel de AFP dentro del intervalo que se observa entre sujetos normales, por ejemplo, sin CHC) CHC (N=39) de cirrosis negativa para AFP (N=84); y con CHC tanto en estadio temprano como AFP negativo (N=29) de cirrosis AFP negativa (N=84). La FIG. 1B resume los valores de sensibilidad en puntos de corte de especificidad del 90% para la discriminación de los mismos grupos de pacientes respectivos en el mismo estudio, y la FIG. 1C resume los valores de sensibilidad en puntos de corte de especificidad del 95% para la discriminación de los mismos grupos de pacientes respectivos en el mismo estudio.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

60 Las presentes invenciones pueden entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras y ejemplos acompañantes, que forman parte de esta divulgación. Debe entenderse que estas invenciones no se limitan a los métodos de ensayo, condiciones o parámetros específicos descritos y/o mostrados en la presente, y que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares a modo de ejemplo solamente y no se pretende que limite las invenciones reivindicadas.

5 Como se emplean anteriormente y a lo largo de la divulgación, se entenderá que los siguientes términos y abreviaturas, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados.

10 En la presente divulgación, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen la referencia plural, y la referencia a un valor numérico particular incluye por lo menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un reactivo" es una referencia a uno o más de tales reactivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y demás. Además, cuando se indica que un determinado elemento "puede ser" X, Y o Z, no se pretende que dicho uso excluya en todos los casos otras opciones para el elemento.

15 Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Como se usa en la presente, "aproximadamente X" (donde X es un valor numérico) se refiere preferiblemente al  $\pm 10\%$  del valor indicado, inclusive. Por ejemplo, la frase "aproximadamente 8" puede referirse a un valor de 7,2 a 8,8, inclusive; como otro ejemplo, la frase "aproximadamente el 8%" puede referirse a un valor del 7,2% al 8,8%, inclusive. Donde estén presentes, todos los intervalos son inclusivos y combinables. Por ejemplo, cuando se enumera un intervalo de "1 a 5", debe interpretarse que el intervalo enumerado incluye opcionalmente los intervalos "de 1 a 4", "de 1 a 3", "de 1 a 2", "de 1 a 2 y de 4 a 5", "de 1 a 3 y 5", y similares. Además, cuando se proporciona positivamente una lista de alternativas, dicha lista también puede incluir realizaciones en las que puede excluirse cualquiera de las alternativas. Por ejemplo, cuando se describe un intervalo de "1 a 5", dicha descripción puede respaldar situaciones en las que se excluye cualquiera de 1, 2, 3, 4 o 5; por lo tanto, una enumeración de "1 a 5" puede respaldar "1 y 3-5, pero no 2", o simplemente "donde 2 no está incluido".

25 Como se usa en la presente, los términos "tratamiento" o "terapia" (así como diferentes formas verbales de los mismos) incluyen tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico), curativo, paliativo o antiproliferativo. Dicho tratamiento preventivo, curativo, paliativo o antiproliferativo puede ser total o parcial. Por ejemplo, la eliminación completa de los síntomas no deseados o la eliminación parcial de uno o más síntomas no deseados representaría un "tratamiento" como se contempla en la presente. La presente invención no abarca la terapia per se, meramente la selección de un tratamiento.

35 La presente divulgación se refiere a métodos de ensayo para detectar carcinoma hepatocelular. A menos que se especifique lo contrario, los pasos, reactivos y factores (como los biomarcadores) que se divulgan con respecto a un aspecto de la presente divulgación (como en relación con cualquiera de los presentes métodos de ensayo) pueden emplearse en relación con cualquier otro aspecto de esta divulgación.

40 Aunque el trabajo anterior ha intentado abordar la necesidad de un predictor temprano altamente sensible del carcinoma hepatocelular mediante la evaluación de uno o más factores biológicos, ninguno se ha acercado al grado de sensibilidad que se requiere para la determinación clínicamente relevante de si un sujeto, especialmente un sujeto asintomático, tiene esa afección. Los presentes inventores han descubierto que ciertas combinaciones de factores satisfacen esta necesidad al conferir un alto nivel de precisión que no era alcanzable anteriormente. Es importante destacar que las combinaciones identificadas pueden utilizar factores que, de manera individual, no han representado detectores precisos de carcinoma hepatocelular, pueden omitir factores que tradicionalmente se ha considerado que representan indicadores de la enfermedad, o ambos. A continuación se describen más completamente en la presente estas y otras características de la materia actualmente divulgada

50 Durante el curso del descubrimiento de la materia objeto actualmente divulgada, los inventores observaron que no era posible identificar ciertas glicofomas, incluyendo las glicofomas que contenían fucosa, de proteínas dentro de un fluido biológico de un sujeto. Los inventores determinaron que había algún material presente en las muestras de los sujetos que producía una señal no específica en los ensayos que se usaron para identificar glicofomas y en última instancia descubrieron que un material de confusión principal era la IgM. Además, se descubrió que la eliminación de tanto IgM como de IgG eliminó la señal contaminante y permitió un análisis preciso de glicofomas de proteínas específicas de una manera que antes no era posible. Sorprendentemente, se ha determinado que los pasos de eliminar IgM y también IgG y los reactivos para llevar a cabo estos pasos representan aspectos clínicamente esenciales del proceso de detección temprana de carcinoma hepatocelular de acuerdo con los presentes métodos de ensayos. En algunas realizaciones, la IgG se elimina incubando el fluido biológico con Proteína A/G, que se descubrió que era más eficaz que otras estrategias probadas, y la IgM se elimina pasando el fluido biológico a través de un filtro. El filtro puede ser, por ejemplo, un filtro de 1000 kD, un filtro de 900 kD, un filtro de 800 kD, un filtro de 500 kD, un filtro de 450 kD, un filtro de 400 kD, un filtro de 350 kD, un filtro de 300 kD, un filtro de 250 kD, un filtro de 200 kD, un filtro de 175 kD, un filtro de 150 kD, un filtro de 125 kD, un filtro de 100 kD, un filtro de 80 kD, un filtro de 75 kD, un filtro de 70 kD, un filtro de 60 kD, un filtro de 50 kD, un filtro de 40 kD, un filtro de 30 kD, un filtro de 25 kD, un filtro de 20 kD, un filtro de 15 kD o un filtro de 10 kD. La filtración puede realizarse, por ejemplo, por gravedad o centrifugación. Alternativamente, tanto la IgG como la IgM pueden eliminarse mediante precipitación usando polietilenglicol. De acuerdo con tales realizaciones, el suero puede incubarse con polietilenglicol

y luego someterse a centrifugación, el sobrenadante resultante representando el material en el que se miden las cantidades respectivas de biomarcadores de interés.

El fluido biológico puede ser sangre completa, suero o plasma.

La "cantidad" de un biomarcador en el fluido biológico puede referirse a su concentración en el fluido biológico, por ejemplo, expresada en términos de ng/ml o, en el caso de que un biomarcador sea una glicoproteína fucosilada, puede referirse a la cantidad del biomarcador en la muestra no se fucosila con respecto a la cantidad del biomarcador en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de biomarcador fucosilado puede expresarse en términos de un porcentaje con respecto a la cantidad total de biomarcador en la muestra.

Trabajos anteriores han identificado más de 50 glicoproteínas que muestran una mayor fucosilación en sujetos que se sabe que tienen carcinoma hepatocelular, cirrosis o ambos (Comunale, M.A., et al. *J Proteome Res.* febrero 2006;5(2):308-15). Varios estudios publicados han evaluado la capacidad de las glicoproteínas fucosiladas individuales para funcionar como marcadores del carcinoma hepatocelular, incluyendo la fetuina A (también llamada alfa-2-HS-glicoproteína) (Comunale, MA, et al. *J. Proteome Res.* 2009; 8; 595-602), quininógeno (Wang, M, et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18; 1914-1921), alfa-1 antitripsina (id.), hemopexina (Comunale, MA, et al. 2009), alfa-1-antiquimotripsina (Comunale, MA, et al. *Proteomics Clin. Appl.* 2013; 7; 690-700), GP73 (Drake, RR, et al. *Mol Cell Proteomics.* 2006; 5; 1957-67), y LRAGG (IgG anti- $\alpha$ -galactosa reactiva a lectina) (Mehta, AS, et al. *J Virol.* 2008; 82; 1259-1270). Entre estas glicoproteínas, las de mejor rendimiento incluyeron, por ejemplo, hemopexina (AUROC=0,87) y fetuina-A (AUROC=0,90). Los presentes inventores han determinado que ciertas combinaciones de factores (a los que puede hacerse referencia como paneles), algunos de los cuales son glicoproteínas fucosiladas, pueden usarse para identificar la presencia de carcinoma hepatocelular con una precisión considerablemente mayor que mediante la evaluación de cualquier glicoproteína individual u otro factor individual. Inesperadamente, ciertas glicoproteínas que funcionaron como los mejores indicadores de carcinoma hepatocelular cuando se evaluaron individualmente tuvieron solo una contribución moderada, o incluso una contribución negativa a los paneles de factores (como una o más glicoproteínas fucosiladas) que incluían la evaluación de tales proteínas, entre otras. Por consiguiente, se descubrió que el trabajo anterior que identificó indicadores individuales de carcinoma hepatocelular no podía usarse para predecir la contribución de esos indicadores a un panel de factores para la identificación de sujetos que tienen carcinoma hepatocelular.

De acuerdo con los presentes métodos de ensayo, los biomarcadores de los que se miden las cantidades respectivas incluyen una pluralidad de biomarcadores que comprenden: alfa-fetoproteína (AFP), quininógeno fucosilado, y fosfatasa alcalina (ALK). La pluralidad de biomarcadores pueden comprender además uno o más de GP-73, hemopexina, HBsAg, partículas virales de hepatitis B, alfa-glicoproteína ácida, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antiquimotripsina His-Pro-less, alfa-1-antitripsina, serotransferrina, ceruloplasmina, alfa-2-macroglobulina, fetuina-A/alfa-2-HS-glicoproteína, haptoglobina, precursor de la cadena gamma del fibrinógeno, inmunoglobulina (incluyendo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE), APO-D, quininógeno, glicoproteína rica en histidina, precursor del factor 1 del complemento, cadena pesada del factor I del complemento, cadena ligera del factor I del complemento, precursor del factor B del complemento, fragmento Ba del factor B del complemento, fragmento Bb del factor B del complemento, precursor C3 del complemento, cadena beta C3 del complemento, cadena alfa C3 del complemento, anafilatoxina C3a, complemento, cadena alfa' C3b, fragmento C3c del complemento, fragmento C3dg del complemento, Fragmento C3g del complemento, fragmento C3d del complemento, fragmento C3f del complemento, C5 del complemento, cadena beta de C5 del complemento, cadena alfa de C5 del complemento, anafilatoxina C5a, cadena alfa C5 del complemento, C7 del complemento, B-2-glicoproteína, proteína de unión a vitamina D, cadena pesada H2 del inhibidor de inter-alfa-tripsina, alfa-1B-glicoproteína, precursor de angiotensinógeno, angiotensina-1, angiotensina-2, angiotensina-3, proteína GARP, beta-2-glicoproteína, clusterina (Apo J), glicoproteína precursora de integrina alfa-8, cadena pesada de integrina alfa-8, cadena ligera de integrina alfa-8, partícula viral de la hepatitis C, elf-5, quininógeno, homólogo de HSP33, lisil endopeptidasa, y precursor de proteína 32 que contiene repeticiones de Leucinerich. En algunas realizaciones, una glicofoma de estas glicoproteínas se mide de acuerdo con los presentes métodos de ensayo. Por ejemplo, pueden medirse formas glicosiladas N-enlazadas de estas glicoproteínas, como la glicofoma N-enlazada fucosilada del biomarcador y, en particular, puede medirse la glicofoma N-enlazada fucosilada en el núcleo. Los biomarcadores adicionales pueden ser uno o más de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, bilirrubina, albúmina, recuento de plaquetas o recuento de glóbulos blancos. Además, el cambio a lo largo del tiempo en la cantidad de cualquiera de los factores mencionados anteriormente puede representar un "biomarcador" de acuerdo con la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, la pluralidad de biomarcadores cuyas cantidades respectivas se miden son uno o más de fetuina-A fucosilada, hemopexina fucosilada, alfa-1-antitripsina fucosilada, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). En un aspecto, los presentes métodos de ensayo comprenden medir la alfafetoproteína, quininógeno fucosilado, ALK y AST. En otro aspecto, los presentes métodos de ensayo comprenden medir la alfa-fetoproteína, quininógeno fucosilado, ALK, AST y alfa-1-antitripsina fucosilada. En un aspecto adicional, los presentes métodos de ensayo comprenden medir la alfa-fetoproteína, quininógeno fucosilado, ALK, AST y fetuina-A fucosilada. Los presentes métodos de ensayo pueden comprender alternativamente medir alfa-

fetoproteína, quinínogeno fucosilado, ALK, AST, fetuina-A fucosilada, y alfa-1-antitripsina fucosilada. Los aspectos que no comprenden los tres biomarcadores independientes de la reivindicación 1 no están abarcados por la invención.

5 Puede usarse cualquier proceso aceptable para determinar las cantidades respectivas de los biomarcadores de acuerdo con los presentes métodos de ensayo. Los biomarcadores de proteínas totales, como la alfafetoproteína total, pueden detectarse usando técnicas convencionales, como un inmunoensayo. Cuando el biomarcador está glicosilado, un reactivo de detección puede marcar directamente las fracciones de glicosilo, por ejemplo, mediante colorantes o productos químicos específicos de carbohidratos, o mediante lectinas marcadas, proteínas de unión a carbohidratos marcadas o anticuerpos marcados. El reactivo de detección puede ser un reactivo secundario, por ejemplo, capturando primero el analito objetivo y luego poniendo en contacto el complejo reactivo de captura-objetivo con un reactivo secundario marcado. En algunas realizaciones, la detección y la cuantificación pueden realizarse separando las fracciones de glicosilo de las proteínas antes de la detección cuantificable de la glicosilación. En otras realizaciones, las glicoproteínas pueden separarse del fluido biológico antes de la detección cuantificable de la glicosilación. Estos enfoques y otros se describen en la Publicación de Estados Unidos N° 2012/0196277, presentada el 10 de abril de 2012. Cuando se usa una lectina para detectar una proteína glicosilada, la lectina puede ser de tipo salvaje o puede ser una lectina recombinante que posee una afinidad de unión aumentada para un glicano particular de interés. Por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N° 2015/0198610, presentada el 3 de febrero de 2012, divulga varias lectinas de *Aleuria aurantia* recombinantes que se caracterizan por una unión mejorada a las fracciones de fucosilo del núcleo, que se sabe que están presentes en mayor grado en las glicoproteínas de sujetos que tienen carcinoma hepatocelular, en comparación con glicoproteínas de sujetos que no tienen la enfermedad.

25 Las cantidades respectivas de ALT y AST pueden determinarse usando un ensayo cinético basado en las actividades enzimáticas respectivas de AST y ALT usando técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, de quimioluminiscencia, de cromatografía, de fluorescencia o absorbancia UV, radioquímicas y electroquímicas para la detección. Los expertos en la técnica están familiarizados con dichos ensayos y técnicas.

30 De acuerdo con los presentes métodos de ensayo, se determinan la edad y el género del sujeto. La edad del sujeto puede expresarse en términos de años, meses o días, según se desee. Se ha demostrado con anterioridad que la edad y el género representan factores relevantes entre los sujetos con carcinoma hepatocelular (ver Wang, M., et al., Proceedings. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine 2012; Wang, M., et al., BMC Medical Genomics, 2013, 6 Suppl 3: S9).

35 Tras la medición de las cantidades respectivas de biomarcadores específicos y la determinación de la edad y el género del sujeto, se determina la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular usando un resultado optimizado de una función de la edad y el género determinados, y las cantidades medidas respectivas de los biomarcadores. Por ejemplo, la función puede comprender coeficientes de ponderación optimizados respectivos para la edad y el género determinados, y para las cantidades medidas de biomarcador. Pueden usarse metodologías estadísticas apropiadas para identificar una función optimizada de la edad, el género y las cantidades de biomarcadores. Por ejemplo, puede usarse regresión logística con respecto a cada panel de factores deseado (es decir, biomarcadores, edad y género), para generar algoritmos de regresión logística. Para juzgar la aptitud de cada regresión pueden derivarse uno o más de AIC,  $R^2$ , Dxy, prueba de razón de verosimilitud, bondad de ajuste de Pearson, verosimilitud logarítmica, estadística de desviación, Tau-a, NRI y el área bajo la curva ROC (AUC) de validación aparente (ver Steyerberg, E. (2009), "Clinical Prediction Models", Springer-Verlag New York). A partir de estos criterios y pruebas, pueden seleccionarse modelos de regresión logística que tuvieran la mayor aptitud para una evaluación posterior. Opcionalmente, para evitar el ajuste excesivo, pueden aplicarse uno o más de la validación cruzada de exclusión, la validación de arranque y la validación cruzada triple para validar los modelos candidatos.

50 La función optimizada de la edad, el género y las cantidades de biomarcadores proporcionan un valor que expresa la probabilidad de que el sujeto tenga carcinoma hepatocelular. De acuerdo con los presentes métodos de ensayo, el valor puede revelar que el sujeto tiene carcinoma hepatocelular con un nivel de certeza clínicamente relevante. Por ejemplo, el nivel de certeza puede ser de aproximadamente el 50% o más, del 60% o más, del 70% o más, del 75% o más, del 80% o más, del 85% o más, del 90% o más, del 91% o más, de aproximadamente el 92% o más, de aproximadamente el 93% o más, de aproximadamente el 94% o más, de aproximadamente el 95% o más, de aproximadamente el 96% o más, de aproximadamente el 97% o más, o de aproximadamente el 98% o más. Por consiguiente, los presentes métodos de ensayo pueden usarse para determinar si un sujeto tiene carcinoma hepatocelular con un grado de certeza muy alto.

60 Como se usa en la presente, "detectar carcinoma hepatocelular" o "determinar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular" puede abarcar la detección de carcinoma hepatocelular en un sujeto que es de un tipo o estadio que normalmente no es detectable por métodos ya existentes en el momento de la presente divulgación. Por ejemplo, los métodos de ensayo divulgados en la presente pueden usarse para determinar si un sujeto tiene carcinoma hepatocelular en estadio temprano; carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína (AFP); o carcinoma hepatocelular en estadio temprano y carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína (AFP) (es

decir, CHC que es tanto de estadio temprano como AFP).

El "carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína (AFP)" se refiere a una enfermedad que no se caracteriza por niveles de AFP que varían significativamente de los niveles de AFP encontrados en sujetos sin enfermedad hepática. Por ejemplo, cuando la cantidad de AFP en una muestra biológica de un sujeto es menor de aproximadamente 20 ng/ml, entonces se puede decir que el sujeto es AFP-.

Significativamente, los datos proporcionados en la presente divulgación, por ejemplo, en las Tablas 3A y 3B, demuestran la capacidad de los métodos de ensayo divulgados en la presente para proporcionar un sistema mediante el cual puede detectarse en un sujeto un carcinoma celular hepatocelular en estadio temprano y/o negativo para alfa fetoproteína. Puede seguir un tratamiento adecuado. El alto grado de significancia clínica de este aspecto de la materia de la invención será evidente para los expertos en la técnica, especialmente dado que el carcinoma hepatocelular en estadio temprano es curable (mientras que la enfermedad en estadio avanzado generalmente solo es elegible para cuidados paliativos). A diferencia de la materia divulgada actualmente, los sistemas anteriores para detectar el carcinoma hepatocelular no han podido detectar el carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína (AFP), o carcinoma hepatocelular en estadio temprano y carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína (AFP).

Por tanto, la presente divulgación también proporciona métodos de ensayo que incluyen recomendar el tratamiento de un sujeto específicamente para el carcinoma hepatocelular en estadio temprano, el carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína o el carcinoma hepatocelular en estadio temprano que también es carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína. Tales métodos de ensayo pueden ser complementarios a los métodos divulgados actualmente para detectar el carcinoma hepatocelular, o pueden ser el resultado del uso de los métodos de ensayo divulgados actualmente. Los médicos pueden identificar los tratamientos apropiados que se van a adaptar específicamente para el carcinoma hepatocelular en estadio temprano, el carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína o el carcinoma hepatocelular en estadio temprano que también es carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína.

Un método de ensayo ejemplar puede comprender la eliminación de proteínas de IgG e IgM de un fluido biológico de un sujeto del que se sospecha que tiene carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para AFP, o ambos; medir la cantidad de uno o más biomarcadores en el fluido biológico; determinar la edad y el género del sujeto; determinar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para AFP, o ambos en el sujeto usando un resultado optimizado de una función de la edad y el género determinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico; y, proporcionar una recomendación de tratamiento del sujeto en el caso de que se determine que el sujeto presenta carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para AFP, o ambos, en donde el tratamiento se selecciona específicamente para el tratamiento de carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para AFP, o ambos. Los aspectos de tales métodos de ensayo relacionados con la eliminación de proteínas de IgG e IgM del fluido biológico, la medición de la cantidad de biomarcadores en el fluido biológico, la determinación de la edad y el género del sujeto y la determinación de la ausencia o presencia de enfermedad usando un resultado optimizado de una función de la edad y el género determinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico pueden realizarse de acuerdo con los aspectos correspondientes de los métodos de ensayo divulgados anteriormente para detectar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular.

El reactivo para eliminar la IgG de un fluido biológico puede ser Proteína A/G. En otras realizaciones, el reactivo puede ser Proteína L. Como se usa en la presente con respecto a los métodos de ensayo divulgados actualmente, el "reactivo" para eliminar la IgM puede ser un artículo de equipo de laboratorio o un sistema mecánico. Por ejemplo, el reactivo para eliminar la IgM puede ser un filtro basado en el peso molecular o un sistema de filtración. La filtración puede realizarse por filtración basada en gravedad o centrífuga, por ejemplo. En otras realizaciones, el reactivo para eliminar tanto IgG como IgM puede ser polietilenglicol, ejemplos no limitativos del cual incluyen PEG-400, PEG-3350, PEG-4000, PEG-6000 y PEG-8000.

De acuerdo con los métodos de ensayo inventivos, puede usarse cualquiera de una variedad de diferentes formatos de ensayo para detectar cuantitativamente uno o más biomarcadores. Los inmunoensayos son un ensayo preferido e incluyen pero no se limitan a ELISA, radioinmunoensayos, ensayos de competición, transferencia Western, ensayos de aglomeración de perlas, inmunoensayos de flujo lateral, tiras reactivas inmunocromatográficas, tiras reactivas e inmunoensayos de formato migratorio. Los expertos en la técnica conocerán otros inmunoensayos adecuados. También puede usarse la microscopía. En algunas realizaciones, la cromatografía representa el formato de ensayo elegido. Se prefiere particularmente la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). En algunas realizaciones, el ensayo preferido es la espectroscopia de masas. En algunas realizaciones, se usa electroforesis en gel junto con densitometría como formato de ensayo.

El formato general de los ensayos puede implicar poner en contacto un reactivo apropiado con una muestra de prueba que contiene los analitos de interés, concretamente los biomarcadores, que pueden distinguirse de otros componentes que se encuentran en la muestra. La muestra puede ser el fluido biológico del sujeto, o puede ser una

muestra separada que se derivó del fluido biológico. Después de la interacción del analito con el reactivo, el sistema puede lavarse y luego detectarse directamente o detectarse por medio de un reactivo secundario.

5 En algunas realizaciones, un reactivo para detectar el biomarcador se inmoviliza sobre un soporte sólido. En otras realizaciones preferidas, la muestra de prueba, o las moléculas separadas o purificadas de la muestra de prueba, como los polipéptidos modificados postraduccionalmente, se inmovilizan sobre un soporte sólido. Las técnicas para la purificación de biomoléculas a partir de muestras como células, tejidos o fluidos biológicos son bien conocidas en la técnica. La técnica elegida puede variar con el tejido o la muestra que se está examinando, pero está dentro de los conocimientos de la técnica hacer coincidir el procedimiento de purificación apropiado con la  
10 fuente de la muestra de prueba.

15 Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio, plástico, metal, látex, caucho, cerámica, polímeros como polipropileno, difluoruro de polivinilideno, polietileno, poliestireno y poliacrilamida, dextrano, celulosa, nitrocelulosa, pvdF, nailon y amilasa. Un soporte sólido puede ser plano, cóncavo o convexo, esférico, cilíndrico, y puede ser partículas, perlas, membranas, cadenas, precipitados, geles, láminas, recipientes, pocillos, capilares, películas, placas o portaobjetos. El soporte sólido puede ser magnético o una columna.

20 Los demás aspectos de los presentes métodos de ensayo, incluyendo los pasos de medir la cantidad de biomarcadores en el fluido biológico, determinar la edad y el género del sujeto; y determinar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular en el sujeto usando un resultado optimizado de una función de la edad y el género determinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, están de acuerdo con cualquiera de los aspectos descritos anteriormente para los métodos de ensayo de la invención para detectar carcinoma hepatocelular en un sujeto.

25 El reactivo para eliminar IgG de un fluido biológico puede ser Proteína A/G. En otras realizaciones, el reactivo puede ser Proteína L. El reactivo para eliminar IgM del fluido biológico puede ser un filtro basado en el peso molecular, como un filtro de 1000 kD, un filtro de 900 kD, un filtro de 800 kD, un filtro de 500 kD, un filtro de 450 kD, un filtro de 400 kD, un filtro de 350 kD, un filtro de 300 kD, un filtro de 250 kD, un filtro de 200 kD, un filtro de 175 kD, un filtro de 150 kD, un filtro de 125 kD, un filtro de 100 kD, un filtro de 80 kD, un filtro de 75 kD, un filtro de 70 kD, un filtro de 60 kD, un filtro de 50 kD, un filtro de 40 kD, un filtro de 30 kD, un filtro de 25 kD, un filtro de 20 kD, un filtro de  
30 15 kD, o un filtro de 10 kD. La filtración puede realizarse, por ejemplo, por gravedad o centrifugación.

35 En ciertas realizaciones, el reactivo para eliminar IgG y el reactivo para eliminar IgM pueden ser el mismo. Una realización ejemplar de este tipo es el polietilenglicol.

40 Cuando un biomarcador es un polipéptido, por ejemplo, una glicoproteína, el reactivo para medir el uno o más biomarcadores en el fluido biológico puede explotar el hecho de que el polipéptido contiene una o más modificaciones postraduccionales (como la glicosilación). La detección de una modificación postraduccional puede lograrse detectando un determinado complejo polipéptido-fracción. En otra realización preferida, la detección de la modificación postraduccional puede llevarse a cabo separando el polipéptido y la fracción y detectando la fracción. La detección del complejo polipéptido-fracción puede llevarse a cabo usando un reactivo que reconozca específicamente la fracción, la clase particular de fracción o la fracción como un complejo con el polipéptido. Los reactivos de detección adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica, ejemplos no limitativos de los cuales se describen a continuación. El reactivo puede comprender múltiples moléculas, cada una de las cuales tiene especificidad para una fracción objetivo diferente, lo que da como resultado múltiples interacciones reactivo-objetivo.  
45

50 El reactivo que se usa para detectar el biomarcador puede ser un anticuerpo. Por ejemplo, puede usarse cualquier anticuerpo que se una específicamente a una fracción objetivo de interés. Pueden usarse anticuerpos monoclonales y/o policlonales, de cualquier fuente producida, al igual que anticuerpos recombinantes como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos presentados en fagos, así como anticuerpos quiméricos y humanizados. También pueden usarse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos como Fab o Fv.

55 En algunas realizaciones, el reactivo para detectar el biomarcador es un anticuerpo que reconoce específicamente glicoproteínas. Preferiblemente, los anticuerpos reconocen específicamente las fracciones de carbohidratos, incluyendo los mono- y los polisacáridos. En algunos casos, los anticuerpos reconocen específicamente las fracciones de fucosa, como los fracciones de fucosilo del núcleo. Se han descrito anticuerpos capaces de reconocer específicamente la fucosa. Ver, por ejemplo, Roy SS et al. (2002) Ann. Bot. 89:293-9; y Srikrishna G et al. (1998) Glycobiology 8:799-811. Como alternativa, los anticuerpos también pueden generarse contra varias fracciones, incluyendo la fucosa, y usarse en la invención. Los métodos para generar y purificar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Además, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo la técnica desarrollada originalmente por Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497.  
60

65 Como el reactivo que se usa para detectar el biomarcador también pueden usarse otras proteínas que poseen dominios de reconocimiento de carbohidratos. Se han descrito proteínas que tienen dominios de

reconocimiento de carbohidratos, ver, por ejemplo, Bouyain S et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:22566-72 (proteína CG2958 de *Drosophila melanogaster* que reconoce fucosa).

5 En realizaciones particularmente preferidas, como el reactivo que se usa para detectar el biomarcador se usan lectinas. Las lectinas pueden obtenerse de cualquier organismo, incluyendo plantas, animales, levaduras, bacterias y protozoos. Las lectinas purificadas están disponibles comercialmente, ver, por ejemplo, el catálogo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las lectinas también pueden aislarse de su fuente natural, o pueden expresarse y purificarse recombinantemente, por medios que son bien conocidos por los expertos en la técnica. La lectina puede, pero no necesita ser específica para una fracción de carbohidrato particular. Se han descrito lectinas específicas de fucosa. Ver, por ejemplo, Mansour M H et al. (2005) Immunobiology. 210:335-48; Amano K et al. (2003) Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:2277-9; Loris R et al. (2003) J. Mol. Biol. 331:861-70; and, Ishida H et al. (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1002-8. La Publicación de Estados Unidos N° 2015/0198610, presentada el 3 de febrero de 2012, divulga varias lectinas de *Aleuria aurantia* recombinantes que se caracterizan por una unión mejorada a las fracciones de fucosilo del núcleo. Se contempla que las lectinas identificadas o desarrolladas en el futuro sean adecuadas para su uso como reactivo para detectar el uno o más biomarcadores de acuerdo con la presente divulgación.

15 Las proteínas con dominios de tipo lectina también son adecuadas para su uso como reactivo para detectar el uno o más biomarcadores. Las proteínas con dominios de tipo lectina se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Drickamer K (1999) Drickamer K (1999) Curr. Opin. Struct. Biol. 9:585-90.

20 También pueden usarse alternativas a las lectinas basadas en ácidos nucleicos. Tales reactivos, denominados aptámeros, aprovechan la gran flexibilidad conformacional de los ácidos nucleicos de cadena sencilla. A partir de grandes grupos de ácidos nucleicos cortos aleatorizados, se han aislado moléculas individuales con alta afinidad por numerosos ligandos que no son ácidos nucleicos mediante selección iterativa. Las ventajas de los reactivos de "lectámero" de unión a glicanos son que es poco probable que los ADN lixiviados confundan o interfieran con los análisis en sentido descendente. Los lectámeros pueden funcionar en condiciones de unión uniformes (pH, fuerza iónica). Los ácidos nucleicos sintéticos pueden prepararse en varias formas derivatizadas (por ejemplo, biotiniladas terminalmente). Los glicanos objetivo no están limitados por las especificidades de las lectinas existentes, lo que amplía sustancialmente las capacidades analíticas y de fraccionamiento existentes.

25 El reactivo para detectar un biomarcador puede marcarse directamente con una fracción detectable. Como alternativa, se usa un reactivo secundario que reconoce específicamente el reactivo primario, que está marcado con una fracción detectable. El reactivo secundario puede ser cualquier molécula, y tal como un anticuerpo. El reactivo secundario está marcado con una fracción detectable. Las fracciones detectables contempladas para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, colorantes fluorescentes como fluoresceína, ficoeritrina, Cy-3, Cy5, alofocianina, DAPI, rojo Texas, rodamina, verde Oregón, amarillo lucifer, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente naranja de Cerianthus, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa, adenosina deaminasa, aminoglicósido fosfotransferasa (neor, G418r) dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina quinasa, lacZ (que codifica  $\alpha$ -galactosidasa) y xantina guanina fosforribosiltransferasa, beta-glucuronidasa, fosfatasa alcalina placentaria, fosfatasa alcalina embrionaria secretada o luciferasa de luciérnaga o bacteriana. Las etiquetas de enzimas se usan con su sustrato cognato. Al igual que con otros procedimientos estándar asociados con la puesta en práctica de la invención, los expertos en la técnica conocerán marcaadores adicionales que pueden usarse. En algunas realizaciones, el reactivo o el reactivo secundario se acoplan a biotina y se ponen en contacto con avidina o estreptavidina que tiene una etiqueta de fracción detectable.

35 En algunas realizaciones, una fracción que está unida a un biomarcador polipeptídico mediante modificación postraducciona puede marcarse y detectarse directamente, obviando de este modo la necesidad de un reactivo marcado que reconozca específicamente una fracción particular así como cualquier necesidad de un reactivo secundario marcado. Para los propósitos de la presente divulgación, la detección del biomarcador abarca la detección de una fracción que se une al biomarcador mediante modificación postraducciona. En algunas realizaciones, la fracción unida al biomarcador por modificación postraducciona puede separarse del biomarcador y marcarse y detectarse directamente. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los carbohidratos y las fracciones de carbohidratos pueden marcarse directamente usando varios métodos que se conocen en la técnica. Los kits de marcado de carbohidratos y fracciones de carbohidratos están disponibles comercialmente. Los carbohidratos y las fracciones de carbohidratos también pueden biotinilarse y marcarse con fracciones detectables conjugadas con avidina o estreptavidina, como las descritas en la presente. Los ejemplos no limitativos de reactivos que pueden marcar directamente oligosacáridos incluyen 2-aminobenzamida y ácido 2-aminobenzoico.

40 Las fracciones unidas postraduccionalmente pueden separarse de un biomarcador polipeptídico mediante cualquier medio adecuado en la técnica, incluyendo químicamente, por ejemplo mediante tratamiento con hidrazina o ácidos como ácido fluorhídrico o ácido trifluorometanosulfónico, enzimáticamente, por ejemplo mediante tratamiento con N-glicosidasa como PNGasa F, O-glicosidasa, endoglicosidasas o exoglicosidasas, o por medios físicos. Hay kits disponibles comercialmente para eliminar modificaciones postraduccionales, incluyendo la

desglucosilación. También pueden usarse bases químicas como la hidracina o los reactivos químicos que llevan a las reacciones de beta-eliminación en las reacciones de desglucosilación. Los expertos en la técnica apreciarán otras técnicas y reactivos, y se contempla que estén dentro del alcance de la presente divulgación.

5 En algunas realizaciones, las fracciones unidas postraduccionalmente anteriormente, separadas se purifican antes del marcado o la detección. Para purificar las fracciones separadas para su posterior análisis pueden usarse las técnicas de extracción en fase sólida o líquida, que son conocidas en la técnica.

10 Como se ha indicado anteriormente, los biomarcadores de proteína total, como la alfafetoproteína total, pueden detectarse usando técnicas convencionales, como inmunoensayos. Esto es de igual manera para los ensayos cinéticos basados en las actividades enzimáticas respectivas de AST y ALT usando técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, quimioluminiscentes, de cromatografía, de fluorescencia o absorbancia UV, radioquímicas y electroquímicas para la detección.

15 Como se ha proporcionado anteriormente de acuerdo con los métodos divulgados actualmente para detectar un carcinoma hepatocelular en un sujeto, la función optimizada de la edad, el género y las cantidades de biomarcadores proporcionan un valor que expresa la probabilidad de que el sujeto tenga carcinoma hepatocelular. El valor puede revelar que el sujeto tiene carcinoma hepatocelular con un nivel de certeza de aproximadamente el 90% o más, aproximadamente el 91% o más, aproximadamente el 92% o más, aproximadamente el 93% o más, aproximadamente el 94% o más, aproximadamente el 95% o más, aproximadamente el 96% o más, aproximadamente el 97% o más, o aproximadamente el 98% o más. De acuerdo con los presentes métodos de ensayo para asignar un sujeto a un grupo que tiene una mayor o menor probabilidad de carcinoma hepatocelular, puede tomarse una decisión clínicamente apropiada en cuanto a si el valor que proporciona la función optimizada debería justificar la asignación del sujeto a un grupo que tenga una mayor o menor probabilidad de carcinoma hepatocelular. Por ejemplo, puede asignarse a un sujeto a un grupo de "probabilidad más alta" cuando el valor que proporciona la función optimizada de la edad, el género y las cantidades de biomarcadores indica que el sujeto tiene carcinoma hepatocelular, y el nivel de certeza asociado con la función es clínicamente significativa. Por ejemplo, el nivel de certeza puede ser por lo menos un 50% más alto, por lo menos un 60% más alto, por lo menos un 65% más alto, por lo menos un 70% más alto, por lo menos un 75% más alto, por lo menos un 80% o más alto, por lo menos un 82% o más alto, por lo menos un 84% o más alto, por lo menos un 85% o más alto, por lo menos un 86% o más alto, por lo menos un 88% o más alto, o por lo menos un 90% o más alto. Los patólogos expertos, en equipo con bioestadísticos y bioinformáticos, pueden aplicar las metodologías estadísticas apropiadas para determinar si un valor proporcionado por una función optimizada particular de la edad, el género y las cantidades de biomarcadores justifica la asignación del sujeto a un grupo que tiene una probabilidad más alta y más baja de carcinoma hepatocelular.

Tras la aplicación de la evaluación estadística apropiada, cuando el resultado de la función optimizada de la edad y el género determinados y los biomarcadores medidos en el fluido biológico del sujeto sea indicativo de la presencia de carcinoma hepatocelular en el sujeto, puede seleccionarse un tratamiento para el sujeto de acuerdo con los presentes métodos de ensayo. Cuando el sujeto es asintomático, los presentes métodos de ensayo permiten ventajosamente la selección de un régimen de tratamiento que tiene en cuenta la estadio temprano del carcinoma hepatocelular en el sujeto. El tratamiento para el carcinoma hepatocelular en estadio temprano puede estar de acuerdo con la práctica médica aceptada. Cuando, según los presentes métodos de ensayo, se determina que el sujeto no tiene carcinoma hepatocelular, puede seleccionarse un tratamiento para el sujeto por cualquier condición precursora o alternativa que pueda aplicarse. Por ejemplo, como se sospechará que el sujeto tiene carcinoma hepatocelular, es posible que ya se haya sabido que el sujeto ha mostrado o se haya descubierto posteriormente que tiene (por ejemplo, como resultado de una prueba motivada por el diagnóstico negativo de carcinoma hepatocelular) cualquiera de los factores de riesgo comunes, como alcoholismo, hepatitis B o hepatitis C, aflatoxina, cirrosis, esteatohepatitis no alcohólica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, diabetes tipo 2, NASH (esteatohepatitis no alcohólica) o hemofilia. El tratamiento para una cualquiera o más de las condiciones que representan factores de riesgo para el carcinoma hepatocelular puede proceder de acuerdo con las medidas apropiadas determinadas por los expertos en la técnica. Además, si se determina que un sujeto no tiene carcinoma hepatocelular, se le puede pedir al sujeto que se someta a una monitorización periódica que puede incluir pruebas de carcinoma hepatocelular en el sujeto en una o más ocasiones futuras. Para los propósitos de los presentes métodos de ensayo, "tratamiento" puede abarcar someter a un sujeto a monitorización periódica para confirmar si el sujeto desarrolla o no carcinoma hepatocelular después de una determinación inicial de que el sujeto no tiene carcinoma hepatocelular. Por ejemplo, de acuerdo con los presentes métodos de ensayo, se determina que un sujeto no tiene carcinoma hepatocelular en base al resultado de la función optimizada de la edad y el género determinados y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, el sujeto puede someterse a uno o más episodios adicionales de pruebas para determinar si el sujeto ha desarrollado posteriormente carcinoma hepatocelular. Pueden realizarse pruebas adicionales, por ejemplo, dos meses, tres meses, seis meses, ocho meses, un año, 18 meses, dos años, 30 meses o tres años después del diagnóstico negativo inicial de carcinoma hepatocelular y, por ejemplo, cada tres meses, cada seis meses, cada año, cada 18 meses, cada dos años, cada 30 meses, cada tres años, cada cuatro años o cada cinco años, hasta que se descubra que el sujeto tiene carcinoma hepatocelular. Las pruebas adicionales pueden estar de acuerdo con los presentes métodos de ensayo para detectar carcinoma hepatocelular

en un sujeto.

### Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y una descripción completas de cómo pueden desarrollarse y evaluarse los métodos de ensayo reivindicados en la presente, y se pretende que sean puramente ejemplares de la invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones.

10

Los Paneles N° 3, 4, 5a, 5b, 6, 7, 8a, 8b, 9, 10, 13, 14 y 15 en la Tabla 2 son ejemplos comparativos.

### Ejemplo 1 - Análisis de datos clínicos e identificación de predictores de CHC

15 El desarrollo de predictores inventivos se logró usando datos de dos cohortes clínicas: una consistía en 115 pacientes con CHC y 93 pacientes con cirrosis (datos de pruebas de función hepática disponibles para esta cohorte) y otra de 66 pacientes con CHC, 38 pacientes con cirrosis (datos de prueba de función no disponibles para esta cohorte).

20 Se emplearon veinticuatro algoritmos de selección de características para explorar cada constituyente potencial del panel (biomarcadores séricos, factores demográficos del paciente) y combinaciones. Los algoritmos de selección de características que se aplicaron incluyeron: filtro de selección de características de correlación (filtro cfs), filtro chi-cuadrado, filtro basado en consistencia, filtro de correlación lineal, filtro de correlación de rango, filtro de ganancia de información, filtro de relación de información, incertidumbre del sistema, algoritmo de búsqueda exhaustivo, búsqueda voraz hacia adelante, búsqueda voraz hacia atrás, búsqueda de subida de colina, algoritmo oneR, filtro de bosque aleatorio, filtro de alivio con 3 vecinos, filtro de alivio con cinco vecinos, regresión logística escalonada, regresión logística penalizada por pasos, svm penalizado, bestglm (bic), bestglm (aic), regresión logística robusta, polinomio fraccional bayesiano para GLM (glmBfp) y media del modelo bayesiano (BMA). Posteriormente, se aplicó la regresión logística con los subconjuntos de predictores, los cuales fueron proporcionados por los 24 algoritmos de selección de características. Hubo 21 características de subconjunto que se seleccionaron de los algoritmos de selección de características y el análisis de la cesta de la compra. A esto, se añadieron predictores completos y AFP al subconjunto de conferencias y, a partir de esto, se construyeron 23 algoritmos de regresión logística. Para juzgar el ajuste de cada regresión, los inventores derivaron AIC,  $R^2$ , Dxy, prueba de razón de verosimilitud, bondad de ajuste de Pearson, verosimilitud logarítmica, estadística de desviación, tau-a, NRI y el área bajo la curva ROC (AUROC) de validación aparente. A partir de estos criterios y pruebas, se seleccionaron cuatro modelos de regresión logística que tenían el ajuste más alto para una evaluación adicional. Para evitar el sobreajuste, se aplicaron la validación cruzada de exclusión, la validación de arranque y la validación cruzada triple para validar los cuatro modelos candidatos.

40 Se evaluaron catorce biomarcadores, variables clínicas y demográficas: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina (BIL), albúmina (ALB), plaquetas (PLT), fosfatasa alcalina (ALK), glóbulos blancos (WBC), alfafetoproteína (AFP), A1AT fucosilada, quinínogeno de bajo peso molecular (LMW) fucosilado, fetuina A fucosilada, hemopexina fucosilada, edad y género. Los valores de AFP se distribuyeron en un intervalo amplio (de 1 a 347.00 ng/ml) y se transformaron logarítmicamente para su posterior análisis. Como la distribución de datos de los factores restantes no influyó en el análisis estadístico y la exploración de algoritmos, se usaron los formatos de datos originales.

50 El análisis preliminar indicó que AFP, ALK, AST, la edad y el género masculino estaban asociados positivamente con la probabilidad de CHC. Hubo una alta proporción de hombres en el grupo de CHC, con una razón de probabilidad de 1,75,  $\chi^2 = 5,36$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,02056$ . Se descubrió que la inclusión de AFP proporcionó valores AUROC superlativamente altos para la discriminación del CHC. Cuando se usó AFP en ausencia de biomarcadores fucosilados, los valores de AUROC variaron de 0,8016 para AFP solo a 0,9066 con la inclusión de cuatro factores adicionales (edad, género, ALK, ALT). Aumentar el número de variables no cambió el AUROC más allá de este valor, lo que sugiere la necesidad de incluir nuevos biomarcadores para impulsar la detección.

55 Para ello, se llevó a cabo una evaluación de paneles que contenían varios biomarcadores. La combinación de AFP, quinínogeno de bajo peso molecular (LMW) fucosilado, A1AT fucosilado, edad y género proporcionó un AUROC de 0,9405. La adición de AST y ALK aumentó el AUROC a 0,9835. La eliminación de A1AT fucosilada redujo la AUROC modestamente a 0,9826. Este último panel mínimo que consiste en quinínogeno de LWM fucosilado, AFP, AST, ALK, edad y género llevó al algoritmo A, a continuación, y se empleó en la generación de los datos del subconjunto de pacientes (por enfermedad en estadio temprano y negativa para AFP) que se muestra en las FIGS. 1A-1C.

65

Algoritmo A

$$P = \frac{1}{1 + \exp(-[-17.7221 + (0.1646 * edad) + (3.9453 * masc.) + (2.4343 * \log AFP) + (1.3748 * \text{quininógeno}) + (0.0239 * ALK) + (-0.0222 * AST)])}$$

Las FIGS. 1A-1C representan los resultados de una evaluación de un panel que consiste en quininógeno de bajo peso molecular fucosilado, alfa-fetoproteína, aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALK), edad y género. El panel se evaluó dentro de una de tres cohortes diferentes de pacientes con CHC y cirrosis. Las tres cohortes de pacientes tenían respectivamente las características descritas en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1

Conjunto de pacientes	Total	CHC	Cirrosis	CHC temprano	CHC Tardío	AFP de CHC <20 ng/mL	AFP de cirrosis <20 ng/mL	CHC temprano <20 ng/mL	CHC tardío <20 ng/mL
<b>a</b>	208	115	93	69	46	39	84	29	10
<b>b</b>	104	66	38	48	17	17	34	14	3
<b>c</b>	40	20	20	6	14	7	18	2	5

En la población usada para generar los datos en la FIG. 1, la etiología del CHC fue del 61% de VHC, 6% de VHB y 33% de otras, y la etiología de la cirrosis fue del 48% de VHC, 10% de VHB y 42% de otras. La FIG. 1A resume los datos de las áreas bajo la curva características operativas del receptor (AUROC) para la discriminación de todos los pacientes con CHC (N=115) de todos los pacientes con cirrosis (N=93); con CHC en estadio temprano (N=69) con cirrosis (N=93); con CHC negativo para AFP (N=39) de cirrosis negativa para AFP (N=84); y con CHC tanto en estadio temprano como negativo para AFP (N=29) de cirrosis negativa para AFP (N=84). Los intervalos de confianza (IC) del 95% no se superpusieron en todos los casos. La FIG. 1B resume los valores de sensibilidad en puntos de corte de especificidad del 90% para la discriminación de los mismos grupos de pacientes respectivos en el mismo estudio, y la FIG. 1C resume los valores de sensibilidad en puntos de corte de especificidad del 95% para la discriminación de los mismos grupos de pacientes respectivos en el mismo estudio.

Como se ha indicado anteriormente, la incorporación de AST y ALK en el modelo desarrollado aumentó la AUC de 0,9405 a 0,9835. La incorporación de estas dos variables clínicas contrarrestó inesperadamente la necesidad de incluir uno de los biomarcadores fucosilados, en este caso, la A1AT fucosilada: cuando se añadieron a la ecuación AST y ALK y se eliminó la A1AT fucosilada del algoritmo, la AUC permaneció en 0,9826, lo que sugiere que un modelo básico altamente predictivo incorporó edad, género, quininógeno, ALK y AST.

Trabajos anteriores identificaron fetuina-A fucosilada y hemopexina fucosilada como indicadores individuales muy buenos de carcinoma hepatocelular (Comunale, MA, et al. J. Proteome Res. 2009; 8; 595-602). Se realizó una evaluación de la contribución de estos biomarcadores fucosilados individuales a un panel que también incluía edad, género y AFP (log). Se empleó el algoritmo B, que se muestra a continuación, para probar un panel que incluía fetuina-A fucosilada y hemopexina fucosilada:

Algoritmo B

$$P = \frac{1}{1 + \exp(-[-11.056 + (0.106 * Edad) + (-1.419 * Masc.) + (2.211 * \log AFP) + (4.329 * \text{Fetuina A}) + (-2.091 * \text{Hemopexina})])}$$

Se usó otro algoritmo para realizar una prueba separada de los mismos miembros del panel (panel 4, mostrado en la Tabla 2, a continuación) y proporcionó una AUC de 0,8461. Cuando se reemplazó la hemopexina por quininógeno (panel 5b en la Tabla 2), la AUC aumentó a 0,8661.

A continuación, en la Tabla 2, se proporciona un resumen de los resultados de la evaluación de los paneles que incluían la edad, la alfafetoproteína y otros biomarcadores específicos.

5

Tabla 2

10

Nº de panel	Biomarcadores fucosilados	Biomarcadores no fucosilados	Valores demográficos	AUC	Conjunto de pacientes
-------------	---------------------------	------------------------------	----------------------	-----	-----------------------

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Quininógeno	AIAT	Fetúina A	Hemopexina	AFP Total	AST	ALT	ALK	Albúmina	Edad	Género		
1	✓				✓	✓		✓		✓	✓	0.9826	a
2	✓	✓			✓	✓		✓		✓	✓	0.9835	a
3			✓		✓					✓	✓	0.9378	b
4				✓	✓					✓	✓	0.8461	b
5a	✓				✓					✓	✓	0.9378	a
5b	✓				✓					✓	✓	0.8661	b
6			✓	✓	✓					✓	✓	0.9653	b
7	✓		✓		✓					✓	✓	0.9378	b
8a	✓	✓			✓					✓	✓	0.9405	a
8b	✓	✓			✓					✓	✓	0.8732	b
9	✓	✓	✓		✓					✓	✓	0.9391	a
10	✓		✓		✓					✓	✓	0.9440	b
11	✓				✓		✓	✓		✓	✓	0.9744	a
12	✓				✓			✓		✓	✓	0.9759	a
13	✓				✓	✓				✓	✓	0.9461	a
14	✓				✓		✓			✓	✓	0.9371	a
15		✓			✓				✓	✓		0.9650	c

Las Tablas 3A y 3B, a continuación, proporcionan AUROC (intervalos de confianza del 95%), sensibilidades (intervalos de confianza del 95%) en las especificidades fijas indicadas y cocientes de probabilidad positivos (LR+) y negativos (LR-) para la discriminación del Panel Nº 1 (como se ha mostrado anteriormente en la Tabla 2) de los siguientes pacientes: (1) CHC (N=115) de cirrosis (N=93); (2) CHC en estadio temprano (UNOS T1/2; N=69) por cirrosis (N=93); (3) CHC negativo para AFP (<20 ng/ml; N=39) de cirrosis negativa para AFP (<20 ng/ml; N=84); y (4) CHC en estadio temprano (UNOS T1/2) y negativo para AFP (<20 ng/ml; N=29) de cirrosis negativa para aAFP (<20 ng/ml; N=84). [Etiología de CHC (%)=VHC (61); VHB (6); otros (33); género de CHC (M/F%)=73/27; Etiología de la cirrosis (%)=VHC (48); VHB (10); otros (42); género de cirrosis (M/F%)=51/49].

Tabla 3A

	Todos CHC (N = 115) frente a todos Cirrosis (N = 93)		CHC temprano (UNOS T1/2; N = 69) frente a todos Cirrosis (N = 93)	
	Panel CHC	AFP	Panel CHC	AFP
<b>AUROC (95% CI)</b>	0.98 (0.97 - 1.00)	0.83 (0.78 - 0.89)	0.98 (0.96 - 1.00)	0.79 (0.72 - 0.86)
<b>Sensibilidad (95% CI) a Especificidad fijada</b>				
<b>95%:</b>	94% (86 - 97%)	58% (49 - 67%)	92%(82 - 97%)	50% (38 - 62%)
<b>90%:</b>	95% (89 - 98%)	65% (55 - 73%)	95% (87 - 99%)	58% (46 - 70%)
<b>85%:</b>	96% (90 - 99%)	70% (61 - 78%)	97% (89 - 99%)	63% (50 - 74%)
<b>LR+ a especificidad fijada:</b>				
<b>95%:</b>	19	12	18	10
<b>90%:</b>	9.5	6.5	9.5	5.8
<b>85%:</b>	6.4	4.7	6.5	4.2
<b>LR- a especificidad fijada:</b>				
<b>95%:</b>	0.063	0.44	0.084	0.53
<b>90%:</b>	0.056	0.39	0.056	0.47
<b>85%:</b>	0.047	0.35	0.035	0.44

Tabla 3B

	CHC AFP-negativo (< 20 ng/mL; N = 39) frente a Cirrosis AFP-negativa (< 20 ng/mL; N = 84)		CHC temprano / AFP-negativo (N = 29) frente a Cirrosis AFP-negativa (N = 84)	
	Panel CHC	AFP	Panel CHC	AFP
<b>AUROC (95% CI)</b>	0.97 (0.95 - 1.00)	0.64 (0.53 - 0.75)	0.96 (0.92 - 0.99)	0.59 (0.47 - 0.71)
<b>Sensibilidad (95% CI) a especificidad fijada:</b>				
<b>95%:</b>	86% (70 - 95%) <sup>1</sup>	14% (5 - 30%) <sup>1</sup>	81% (62 - 94%)	10% (2 - 27%)
<b>90%:</b>	89% (73 - 97%)	31% (17 - 49%)	85% (66 - 96%)	14% (4 - 32%)
<b>85%:</b>	91% (77 - 98%)	31% (17 - 49%) <sup>2</sup>	89% (71 - 98%)	24% (10 - 44%)
<b>LR+ a especificidad fijada:</b>				
<b>95%:</b>	221	3.51	16	2.0
<b>90%:</b>	8.9	3.1	8.5	1.4
<b>85%:</b>	6.1	2.22	5.9	1.6
<b>LR- a especificidad fijada:</b>				
<b>95%:</b>	0.151	0.901	0.20	0.95
<b>90%:</b>	0.12	0.77	0.17	0.96
<b>85%:</b>	0.11	0.802	0.13	0.89

<sup>1</sup>A 96% de especificidad.  
<sup>2</sup>A 86% de especificidad.

Las Tablas 4A y 4B, a continuación, proporcionan AUROC (intervalos de confianza del 95%) y sensibilidades (intervalos de confianza del 95%) en las especificidades fijas indicadas para la discriminación por

parte del Panel N° 11 (como se ha mostrado anteriormente en la Tabla 2) de los siguientes pacientes: (1) CHC (N=115) de cirrosis (N=93); (2) CHC en estadio temprano (UNOS T1/2; N=69) de cirrosis (N=93); (3) CHC negativo para AFP (<20 ng/ml; N=39) de cirrosis negativa para AFP (<20 ng/ml; N=84); y (4) CHC en estadio temprano (UNOS T1/2) y negativo para AFP (<20 ng/ml; N=29) de cirrosis negativa para AFP (<20 ng/ml; N=84). [Etiología de CHC (%)=VHC (61); VHB (6); otros (33); género de CHC (M/F%)=73/27; Etiología de la cirrosis (%)=VHC (48); VHB (10); otros (42); género de cirrosis (M/F%)=51/49]. Estos datos se obtuvieron usando el Algoritmo A (excepto que los valores de AST fueron reemplazados por valores de ALT) y validación cruzada triple.

**Tabla 4A**

	Todos CHC (N = 115) frente a todos Cirrosis (N = 93)		CHC temprano(UNOS T1/2; N = 69) frente a todos Cirrosis (N = 93)	
	Panel CHC	AFP	Panel CHC	AFP
<b>AUROC (95% CI)</b>	0.977 (0.960 - 0.994)	0.844 (0.787 - 0.902)	0.971 (0.947 - 0.994)	0.803 (0.723 - 0.878)
<b>Sensibilidad (95% CI) a especificidad fijada:</b>	90% (80 - 97%)	60% (48 - 71%)	86% (68 - 97%)	53% (38 - 67%)
<b>95%</b>	94% (86 - 99%)	66% (53 - 77%)	92% (81 - 98%)	59% (44 - 73%)
<b>90%</b>	96% (90 - 99%)	69% (57 - 80%)	95% (86 - 100%)	62% (48 - 76%)
<b>85%</b>				

**Tabla 4B**

	CHC AFP-negativo (< 20 ng/mL; N = 39) frente a Cirrosis AFP-negativa (< 20 ng/mL; N = 84)		CHC temprano / AFP-negativo (N = 29) frente a Cirrosis AFP-negativa (N = 84)	
	Panel CHC	AFP	Panel CHC	AFP
<b>AUROC (95% CI)</b>	0.965 (0.935 - 0.996)	0.637 (0.523 - 0.751)	0.970 (0.936 - 1)	0.597 (0.473 - 0.721)
<b>Sensibilidad (95% CI) a especificidad fijada:</b>	82% (62 - 97%)	9% (0 - 35%)	89% (70 - 100%)	0% (0 - 24%)
<b>95%</b>	88% (74 - 97%)	24% (3 - 44%)	100%	14% (0 - 35%)
<b>90%</b>	91% (77 - 100%)	33% (12 - 53%)	89% (77 - 100%)	19% (4 - 46%)
<b>85%</b>			92% (77 - 100%)	

Tras la revisión de los datos en su conjunto, resultó inesperado que las variables que contribuyeron a los paneles de mayor rendimiento tendieron a ser las menos eficaces como indicadores de carcinoma hepatocelular de manera individual. Por ejemplo, la hemopexina proporcionó el valor de AUC más alto cuando se usó sola (0,8695 en el conjunto de pacientes b), y A1AT (conjunto de pacientes a), AFP (conjunto de pacientes a) y quininógeno (conjunto de pacientes a) proporcionaron los valores de AUC más bajos cuando se usaron solos (0,7395, 0,8346 y 0,8192, respectivamente), pero este último contribuyó a paneles de mayor rendimiento que los que contenían hemopexina. De estos datos se aprendió que no es posible predecir la contribución de un biomarcador particular a un panel en base a la capacidad individual de ese biomarcador para determinar la presencia de carcinoma hepatocelular.

Los datos también revelan la capacidad de los paneles probados para permitir la detección de carcinoma celular hepatocelular en estadio temprano, carcinoma celular hepatocelular negativo para AFP y carcinoma celular hepatocelular en estadio temprano que también es carcinoma celular hepatocelular negativo para AFP.

**Ejemplo 2 - Identificación de IgG e IgM como contaminantes del ensayo**

Los ensayos basados en placas para la detección de carcinoma hepatocelular se han visto obstaculizados

convencionalmente por la presencia de anticuerpos heterófilos y, potencialmente, por otros contaminantes que se unen a la lectina. Se sabe que tales contaminantes conducen a resultados falsos positivos. Se llevó a cabo un estudio para identificar los factores contaminantes reactivos a la lectina presentes en el suero de las personas con cirrosis y cáncer de hígado. Como se describe a continuación, los presentes inventores identificaron IgM como el factor reactivo de lectina contaminante, y cuando se eliminó la IgM del suero antes de lectina-ELISA, se pudieron detectar señales reactivas de lectina asociadas a proteínas específicas. Este método se usó en dos conjuntos de muestras independientes para validar el método y también para validar el rendimiento de las glicofomas fucosiladas como biomarcadores del carcinoma hepatocelular.

## 10 *Métodos*

Se obtuvieron muestras de suero de la sangre de cada sujeto de prueba, así como información demográfica y clínica para la población de pacientes. Se inscribieron en el estudio pacientes consecutivos con CHC y pacientes con cirrosis que tenían la misma edad, género y raza/etnicidad que los pacientes con CHC. El diagnóstico de CHC se realizó mediante histopatología, incluyendo todas las lesiones T1 y, si no se disponía de histopatología, mediante dos modalidades de imagenología (ultrasonidos imagenología por resonancia magnética o tomografía computarizada) que mostraban una masa vascular realzada >2 cm. El diagnóstico de cirrosis se basó en la histología hepática o evidencia clínica, de laboratorio y de imagenología de descompensación hepática o hipertensión portal. Cada uno de los pacientes con cirrosis tenía ultrasonidos normales y, si la AFP sérica estaba elevada, no se mostró masa hepática en una MRI del hígado en el plazo de los tres meses anteriores a la inscripción, y otra MRI seis meses después de la inscripción. Los controles cirróticos fueron seguidos durante una mediana de 12 meses (intervalo: 7-18 meses) después de la inscripción y ninguno había desarrollado CHC. La estadificación del tumor se determinó usando el sistema de estadificación TNM modificado por la United Network of Organ Sharing para CHC. El CHC temprano se definió como lesiones T1 (lesión única de <2 cm de diámetro) y T2 (lesión única de entre 2 y 5 cm de diámetro; o <3 lesiones cada una de <3 cm de diámetro), que cumplían los criterios para trasplante de hígado en los Estados Unidos. Se extrajo una muestra de sangre de 20 ml de cada sujeto, se centrifugó, se dividió en alícuotas y el suero resultante se almacenó a -80°C hasta la prueba. Se extrajeron muestras de sangre antes de iniciar el tratamiento de CHC. La AFP se probó usando inmunoensayos disponibles comercialmente utilizando quimioluminiscencia potenciada.

## 30 *Lectina ELISA*

Brevemente, para eliminar la fucosilación del anticuerpo de captura (AAT antihumano de ratón o antifetuina de conejo, AbD Serotec, Raleigh, NC), se incubó el anticuerpo con peryodato de sodio 10 mM durante 1 hora a 4° C. Se añadió un volumen igual etilenglicol y el anticuerpo oxidado se llevó a una concentración de 10 µg/ml con tampón de carbonato de sodio, pH 9,5. Se añadió el anticuerpo (5 µg/pocillo) a la placa y, después de la incubación, se lavó con Tween® 20 al 0,1% (polisorbato 20)/PBS7. 4 y se bloqueó durante la noche con BSA/PBS al 3%. Para el análisis, se diluyeron 5 µl de suero en 95 µl de Heterophilic Blocking Tubes™ (Scantibodies Laboratory, Inc., Santee, CA) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se añadieron a las placas durante 2 horas y se lavaron cinco veces en tampón de incubación de lectina (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20® al 0,1%) antes de detectar la proteína fucosilada con lectina de Aleuria aurantia (AAL) conjugada con biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La lectina unida se detectó usando estreptavidina conjugada IRDye™ 800 y la intensidad de la señal se midió usando el sistema de imagenología infrarroja Odyssey® (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebr.). En todos los casos, la intensidad de la señal se comparó con las señales detectadas con suero humano adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se observa que la lectina-ELISA detecta la cantidad de fucosilación presente en una cantidad igual de moléculas capturadas de cada muestra de paciente y se realiza de una manera independiente de la cantidad total de proteína en cualquier paciente dado.

## 50 **Identificación proteómica de factores contaminantes**

### *Lectina-Western*

El suero se agotó de IgG usando perlas de agarosa recubiertas de proteína A/G y se inmunoprecipitó A1AT usando Dynabeads® magnéticas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) recubiertas con anti-A1AT monoclonal (AbD Serotec, Raleigh, NC). Posteriormente, se eluyó A1AT y se resolvió mediante SDS-PAGE. La A1AT fucosilada se detectó usando lectina de Aleuria aurantia (AAL) conjugada con biotina. La AAL unida se visualizó usando estreptavidina conjugada IRDye™ 800 y la intensidad de la señal se midió usando el sistema de imagenología infrarroja Odyssey® (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebr.). Posteriormente, se detectó la A1AT usando un anti-A1AT policlonal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se detectó el anticuerpo unido usando un anticuerpo anticonejo conjugado IRDye™ 700.

En un análisis previo de un pequeño conjunto de muestras de 40 pacientes, 20 con cirrosis hepática y 20 con cirrosis hepática y CHC, el método de lectina-ELISA con lectina no pudo detectar específicamente la fucosilación alterada de una proteína dada. Por ejemplo, se realizaría un ELISA de lectina para alfa-1-antitripsina fucosilada (A1AT). En este método, el anticuerpo contra A1AT, que se ha modificado para eliminar su fucosilación inherente, se

recubre en el fondo de una placa de 96 pocillos. Se añade suero agotado de IgG usando proteína A/G y se detecta el nivel de fucosilación de A1AT capturado usando una lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) recombinante. Cuando se realiza un ensayo de este tipo usando suero de CHC, se observa una señal reactiva de lectina. Sin embargo, no fue posible competir con esta señal usando A1AT no fucosilada, incluso cuando la A1AT no fucosilada se había unido al anticuerpo de captura. Además, el uso de un anticuerpo no específico, como AFP en un paciente negativo para AFP, llevó a la misma señal no específica. La digestión triptica de la muestra antes del análisis confirmó que la señal se basaba en proteínas.

#### Identificación de IgM como posible contaminante

En un esfuerzo por identificar el material reactivo de lectina no específico que se encuentra en el suero, se realizó un ELISA de lectina en placas de 96 pocillos para A1AT. Las placas se incubaron con suero usando condiciones idénticas a las de un ELISA de lectina normal, pero antes de añadir la lectina, la muestra se incubó con tampón de lisis SDS y la muestra se examinó mediante SDS-PAGE y transferencia de lectina con lectina de unión a fucosa mediante tinción con azul brillante de Coomassie coloidal, o mediante transferencia para detectar la presencia de A1AT humano. Se observó una fuerte tinción de lectina con una banda de ~80 kD con una banda más débil observada a 50 kD. Mientras que la banda de 50 kD también se observó después de la tinción con azul brillante de Coomassie coloidal y tiñendo con el anticuerpo A1AT, la banda de ~80 kD no se observó mediante la tinción con azul brillante de Coomassie coloidal o la transferencia de lectina A1AT. Esto sugirió que el material reactivo de lectina no específico en estas muestras era una glicoproteína de 80 kD que estaba altamente fucosilada. Posteriormente, los pocillos tratados de manera idéntica se recogieron después de la captura por ELISA y se examinaron proteómicamente después de la digestión con tripsina. La lista de glicoproteínas identificadas en estas muestras se muestra en la Tabla 5, a continuación, y se observaron las dos proteínas principales que tenían un tamaño similar al observado en la transferencia de lectina: el complemento B y la cadena pesada de IgM.

**Tabla 5**

Gen asociado	Nombre de proteína	Recuentos espectrales
KRT1	queratina 1 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6412]	450
APOA1	apolipoproteína A-I [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:600]	345
KRT9	queratina 9 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6447]	283
KRT10	queratina 10 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6413]	224
APOE	apolipoproteína E [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:613]	214
KRT2	queratina 2 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6439]	161
SERPINA1	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (Alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1, isoforma CRA_a [Fuente:UniProtKB/TrEMBL;Acc: A0A024R6I7]	131
	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:8941]	5
KRT16	queratina 16 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6423]	126
KRT14	queratina 14 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6416]	85
KRT5	queratina 5 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6442]	76
C1QC	componente 1 del complemento, subcomponente q, cadena C [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:1245]	65
C1QB	componente 1 del complemento, subcomponente q, cadena B [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:1242]	62
C1S	componente 1 del complemento, subcomponente s [Fuente:HGNC Símbolo; Acc:HGNC:1247]	52
APOB	apolipoproteína B [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:603]	49
A2M	alfa-2-macroglobulina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:7]	49
F2	factor de coagulación II (trombina) [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC: 3535]	49

(continuación)

	<b>Gen asociado</b>	<b>Nombre de proteína</b>	<b>Recuentos espectrales</b>
5	APOC1	apolipoproteína C-I [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:607]	46
	KRT6A	queratina 6A [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6443]	44
	HBB	hemoglobina, beta [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:4827]	43
10	CLU	clusterina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:2095]	40
	DSP	desmoplakina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:3052]	39
	VTN	vitronectina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC: 12724]	36
15	SAA2-SAA4	SAA2-SAA4 lectura completa [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:39550]	31
	APOA4	apolipoproteína A-IV [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:602]	28
20	IGHG1	gamma 1 constante pesada de inmunoglobulina (marcador G1m) [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:5525]	26
	APOA2	apolipoproteína A-II [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:601]	26
	C3	componente 3 del complemento [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:1318]	22
25	HBA2	hemoglobina, alfa 2 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:4824]	21
	DSG1	desmogleina 1 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:3048]	19
	KRT17	queratina 17 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:6427]	19
30	IGHM	mu constante pesada de inmunoglobulina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC: 5541]	19
	HRNR	homerina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:20846]	17
35	C1R	componente 1 del complemento, subcomponente r [Fuente:HGNC Símbolo;Acc: HGNC:1246]	17
	CD14	molécula CD14 [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:1628]	15
40	APOC3	apolipoproteína C-III [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:610]	15
	AGT	angiotensinogeno (inhibidor de peptidasa serpina, clado A, miembro 8) [Fuente: HGNC Símbolo;Acc:HGNC:333]	14
45	TRAJ56	unión alfa 56 del receptor de células T [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC: 12088]	14
	IGHA1	alfa 1 constante pesada de inmunoglobulina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc: HGNC:5478]	12
50	ALB	albúmina [Fuente:HGNC Símbolo;Acc:HGNC:399]	12

Posteriormente, se repitió el mismo experimento ELISA de lectina descrito anteriormente con anticuerpos anticomplemento B y anti-IgM. Aunque no hubo tinción en el material capturado con el anticuerpo anti-complemento B, la inmunotransferencia mostró que el material reactivo de lectina de 80 kD encontrado en estas muestras era cadena pesada de IgM. La banda de 80 kD representa la cadena pesada de IgM que es indicativa de la molécula de IgM completa. En total, hay 10 cadenas pesadas por molécula de IgM.

En un esfuerzo por eliminar la IgM nativa de las muestras de suero, se desarrollaron métodos para eliminar este material del suero antes del análisis lectina-ELISA. Inicialmente, se usó proteína L, pero proporcionó resultados insatisfactorios. Posteriormente, se usó un método que consistía en incubar el suero con 20 µl de proteína A/G Plus Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) durante una hora, seguido de la filtración de la mezcla en un filtro giratorio de 100 kD para para eliminar tanto IgG como IgM del suero antes del ELISA de lectina. Cuando se usó este método, IgG e IgM se eliminaron eficientemente del suero, según se determinó tanto por inmunotransferencia como por transferencia de lectina. Posteriormente, después de la eliminación de IgM e IgG usando este método, fue posible bloquear la señal de A1AT reactiva de lectina usando A1AT no fucosilada, lo que demuestra el descubrimiento de que la presencia de IgG e IgM eran responsables de contaminar la señal observada en estas

muestras.

5 La capacidad de este método para ser usado para el análisis de glicoformas fucosiladas de A1AT se  
examinó usando un pequeño conjunto de muestras donde los métodos Lectina-ELISA habían fallado anteriormente.  
Este conjunto consistía en 20 pacientes con cirrosis y 20 pacientes con CHC en el contexto de la cirrosis. Es  
importante destacar que, en este conjunto, se determinaron los datos de lectina-transferencia que muestran A1AT  
10 reactiva a lectina y actúa como el patrón de referencia para la lectina-ELISA (Comunale, MA., et al. Proteomics Clin.  
Appl. 2013; 7; 690-700) y permitió una comparación entre el rendimiento de la lectina-ELISA con y sin filtración.  
Usando el método sin filtración, el valor medio de la muestra cirrótica fue de 3,2 ( $\pm 2,0$ ) y la muestra de CHC fue de  
2,9 ( $\pm 1,8$ ). No hay diferencia estadística entre la señal reactiva de lectina en estas muestras ( $p=0,74$ ). El AUROC de  
este ensayo fue de 0,578. Por el contrario, usando el método de filtración de la invención, el ELISA de lectina dio  
15 como resultado un valor medio de 1,4 ( $\pm 0,75$ ) en la muestra cirrótica y 2,4 ( $\pm 1,1$ ) en las muestras de CHC. Esta  
diferencia fue estadísticamente diferente ( $P=0,0016$ ). Al comparar las muestras antes y después de la filtración, hubo  
una diferencia estadística entre las muestras de cirrosis antes y después de la filtración ( $p=0,0005$ ), pero no entre las  
muestras de CHC antes y después de la filtración ( $p=0,5249$ ).

El AUROC de la comparación entre las muestras de CHC y cirrosis después de la filtración fue de 0,788,  
que fue casi idéntico al observado por la transferencia de lectina (Comunale, et al., 2013). Es importante destacar  
que hubo un alto grado de correlación entre la transferencia de lectina y la lectina-ELISA después de la filtración. Es  
20 importante destacar que cada muestra que fue positiva para lectina-ELISA después de la filtración resultó ser  
positiva por transferencia de lectina, y cada muestra que resultó negativa para lectina-ELISA después de la filtración  
resultó negativa para transferencia de lectina.

Este ensayo se usó posteriormente para evaluar la presencia de antitripsina alfa-1 fucosilada y quinínogeno  
25 fucosilado en 80 muestras independientes. Las muestras se examinaron usando lectina-ELISA de filtración y lectina-  
ELISA sin filtrar. Mientras que el análisis sin filtrar no dio como resultado ninguna diferencia entre las muestras de  
CHC y de control, el análisis filtrado proporcionó una diferencia estadísticamente significativa.

30 *Procedimiento alternativo para la eliminación de contaminantes IgG e IgM.*

Se desarrolló un método alternativo para eliminar IgG e IgM mediante el cual el suero se incubó con PEG-  
8000, se centrifugó y el sobrenadante se analizó en el ELISA de lectina. Por ejemplo, para el análisis de A1AT  
fucosilada o fetuina A fucosilada, se añadieron 2  $\mu$ l de suero a 8  $\mu$ l de PBS y posteriormente se añadieron 6  $\mu$ l de  
solución acuosa de PEG-8000 al 40% para una concentración final de PEG-8000 del 15%. La muestra se mezcló  
35 introduciéndola y extrayéndola de una pipeta 10-20 veces y luego agitándola en vórtice brevemente. A continuación,  
la muestra se incubó en una máquina de agitación a 1000-1500 rpm durante 30 minutos y luego se continuó la  
incubación con agitación lenta a 4° C durante la noche. A la mañana siguiente, la muestra se centrifugó a 14.000  
rpm a 4° C y el sobrenadante se transfirió rápidamente a un tubo nuevo antes de realizar el ELISA de lectina. La  
40 eficacia de la eliminación de IgG e IgM se confirmó usando metodologías similares a las del procedimiento original  
para eliminar las inmunoglobulinas, por ejemplo, por inmunotransferencia o por transferencia de lectina.

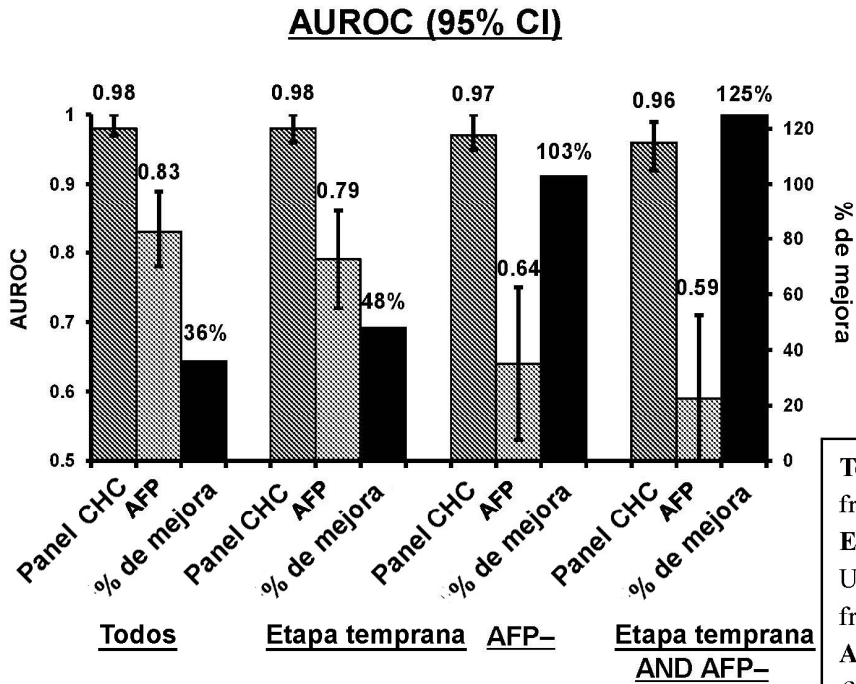
## REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo para detectar carcinoma hepatocelular en un sujeto que comprende:
- 5        medir la cantidad de una pluralidad de biomarcadores en un fluido biológico del sujeto, en donde el método de ensayo elimina proteínas de IgG e IgM del fluido biológico del sujeto antes de medir la cantidad de biomarcadores que son glicofomas que contienen fucosa; determinar la edad y el género del sujeto; y,
- 10        determinar la ausencia o presencia de carcinoma hepatocelular en el sujeto usando un resultado optimizado de una función de la edad y género determinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, en donde el fluido biológico es sangre completa, suero, o plasma y en donde la pluralidad de biomarcadores comprenden: alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, y fosfatasa alcalina (ALK).
- 15        2. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la función comprende coeficientes de ponderación optimizados respectivos para la edad y género determinados, y para las cantidades medidas de la pluralidad de biomarcadores.
- 20        3. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la pluralidad de biomarcadores comprende además uno o más de fetuina-A fucosilada, hemopexina fucosilada, alfa-1-antitripsina fucosilada, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).
- 25        4. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la pluralidad de biomarcadores comprende además aspartato aminotransferasa (AST).
- 30        5. El método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde la pluralidad de biomarcadores son
- 35        (i) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK) y aspartato aminotransferasa (AST);  
(ii) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y alfa-1-antitripsina fucosilada;  
(iii) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y fetuina-A fucosilada; o  
(iv) alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST), fetuina-A fucosilada y alfa-1-antitripsina fucosilada.
- 40        6. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la pluralidad de biomarcadores son alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK) y aspartato aminotransferasa (AST).
- 45        7. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la pluralidad de biomarcadores son alfa-fetoproteína (AFP), quinínogeno fucosilado, fosfatasa alcalina (ALK), aspartato aminotransferasa (AST) y alfa-1-antitripsina fucosilada.
- 50        9. El método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el método de ensayo utiliza reactivos para eliminar las proteínas de IgG e IgM.
- 55        10. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el reactivo que elimina IgG y el reactivo que elimina IgM son iguales.
- 60        11. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el reactivo que elimina IgG es proteína A/G, y el reactivo que elimina IgM es un filtro basado en peso molecular.
- 65        12. El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la IgG y la IgM se eliminan incubando el fluido biológico con polietilenglicol.
13. El método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el carcinoma hepatocelular es carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína, o carcino hepatocelular en estadio temprano que también es carcinoma hepatocelular negativo para alfa fetoproteína.
14. El método de ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el método de ensayo comprende además seleccionar un tratamiento en base al resultado optimizado de una función de la edad y el género determinados, y los biomarcadores medidos en el fluido biológico, en donde el tratamiento es para carcinoma

hepatocelular cuando se determina que el sujeto tiene la enfermedad en base al resultado de la función.

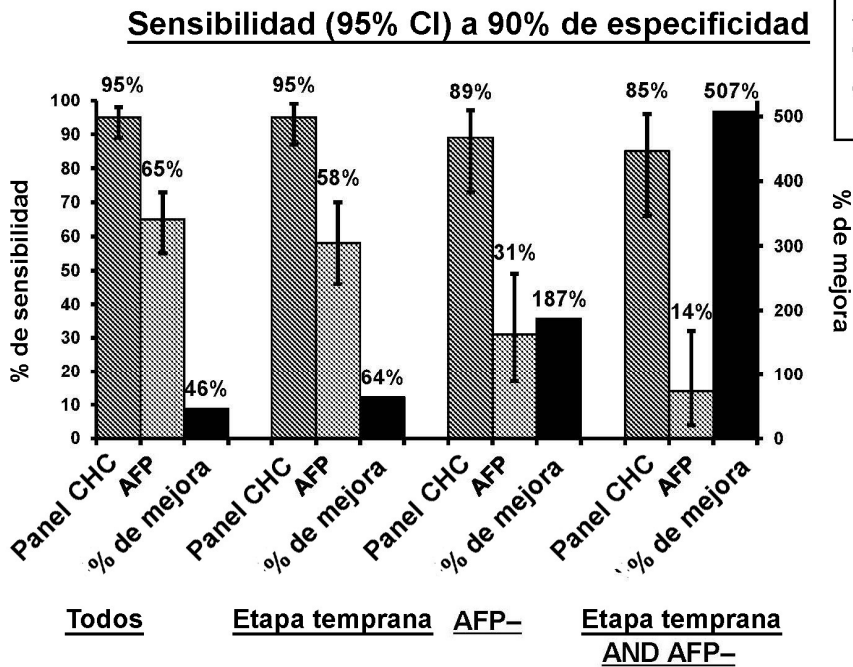
FIG. 1

A



Todos: CHC (N=115) frente a cirrosis (N=93)  
 Etapa temprana: CHC UNOS etapa T1/T2 (N=69) frente a cirrosis (N=93)  
 AFP- (<20 ng/ml): CHC (N=39) frente a cirrosis (N=84)  
 AND AFP- etapa temprana: CHC (N=29) frente a cirrosis (N=84)

B



C

**Sensibilidad (95% CI) a 90% de especificidad**

