



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 337 791**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04783123 .5**

(96) Fecha de presentación : **03.09.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1664718**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54) Título: **Diagnóstico y monitorización del carcinoma hepatocelular.**

(30) Prioridad: **05.09.2003 US 500657 P**

(73) Titular/es: **Thomas Jefferson University  
1020 Walnut Street  
Philadelphia, Pennsylvania 19107, US  
Saint Louis University y  
The United States of America as Represented by  
the Department of Veterans Affairs**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2010**

(72) Inventor/es: **Romano, Patrick, R.;  
Block, Timothy, M.;  
Fimmel, Claus, J. y  
Nikolaeva, Olga**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2010**

(74) Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

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

## DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y monitorización del carcinoma hepatocelular.

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere al diagnóstico del carcinoma hepatocelular (HCC) a través de la detección de marcadores biológicos de HCC en suero, en concreto a través de la detección de la proteína GP73 en suero. La invención también se refiere a la monitorización de sujetos para el desarrollo del HCC, a través de la evaluación de los niveles de GP73 en suero.

**Antecedentes de la invención**

El HCC es el quinto cáncer más prevalente en el mundo. Sin embargo, debido a que la enfermedad es a menudo refractaria al tratamiento, el HCC es la tercera causa principal de la mortalidad mundial por cáncer, con una tasa de supervivencia de cinco años tras el diagnóstico de menos del cinco por ciento.

La principal etiología del HCC es la infección crónica por el virus de la hepatitis B (HBV) o el virus de la hepatitis C (HCV). El largo periodo de latencia entre la infección por HBV ó HCV y la aparición del HCC en esta población de alto riesgo proporciona una oportunidad para la detección temprana mucho antes de la aparición de una enfermedad grave. Por lo tanto pueden monitorizarse poblaciones en riesgo para HCC para los bio-marcadores de la enfermedad a medida que se hacen disponibles. Además, a medida que se hacen disponibles más opciones terapéuticas, la detección temprana del HCC resulta importante para mejorar la pronóstico de los pacientes.

Actualmente, el estado de la enfermedad de HCC se monitoriza por lo general mediante valoración física, visualización por ultrasonidos del hígado o análisis de suero para un panel de marcadores. Puesto que existe una buena correlación entre los niveles elevados de alfa fetoproteína (AFP) y la aparición de HCC; la determinación de los niveles de AFP a menudo se incluye como un marcador sérico de la enfermedad. Sin embargo la AFP como indicador único de HCC resulta de valor limitado, ya que esta proteína suele encontrarse elevada en ausencia de una enfermedad grave. Su valor en la detección de HCC asociado a HCV está incluso menos claro. Sin embargo, incluso la limitada correlación entre AFP y HCC subraya el potencial del suero como fuente de bio-marcadores de las hepatopatías.

La clasificación clínica de los portadores de HBV y HCV puede dividirse generalmente en cuatro categorías clínicas: inactivo, activo, cirrótico y HCC. Aunque una categoría dada no resulta necesariamente un precursor de lo sucesivo, el HCC puede considerarse una etapa final en la progresión de la hepatopatía en un sujeto infectado. Para facilitar la detección temprana y pronóstico de la enfermedad, resultaría altamente deseable la identificación de marcadores moleculares séricos (polipéptidos, glicopéptidos y proteoglicanos), cuya abundancia se correlacione con estas categorías clínicas.

La GP73 es una proteína trans-membrana del Golgi de tipo II que se expresa a un nivel alto en los hepatocitos de los pacientes con hepatitis vírica (Kladney, *et al.*, 2.000, Gene 249, 53-65). La GP73 se expresa constitutivamente en las células epiteliales biliares, y se expresa mínimamente en los hepatocitos normales. En contraposición, los hígados de pacientes con hepatitis de células gigantes presentan una fuerte inmunoreactividad a la GP73 en los hepatocitos multi-nucleados. El ARNm de GP73 y la proteína se expresan en las células del hematoma HepG2 altamente diferenciadas tras la infección con virus, que incluye los adenovirus. Debido a que la GP73 es una proteína trans-membrana del Golgi, no se espera que exista en cantidades significativas en el suero, ni siquiera en sujetos con hígados enfermos o lesionados.

Se han descubierto aumentos significativos de GP73 a nivel de todo el organismo en la hepatopatía debida a causas víricas (HBV, HCV) o causas no víricas (hepatopatía inducida por el alcohol, hepatitis autoinmune); véase Kladney, *et al.*, 2.002, Hepatology 35(6): 1431-40. La expresión de GP73 en los hepatocitos no se encuentra regulada en los hígados enfermos, independientemente de la etiología, mientras que la expresión en las células epiteliales biliares no cambia de manera apreciable.

Aunque estos informes resultan interesantes, la detección de GP73 en las células hepáticas requiere que el paciente se someta a una biopsia de hígado, lo que resulta doloroso e inconveniente.

Por lo tanto, lo que se necesita, es una prueba simple y rápida para determinar el alcance de la hepatopatía y de la lesión causada por la infección del virus de la hepatitis. Una prueba sérica para un bio-marcador de HCC proporcionaría esa velocidad y simplicidad.

WO 03/010336 describe unos marcadores diagnósticos para HCC, incluyendo una proteína transmembrana del Golgi de 63kD depositada bajo el número de entrada NM-001518.1.

**65 Resumen de la invención**

La presencia de niveles elevados de GP73 o de un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, en el suero de un sujeto indica si el sujeto está padeciendo de o ha desarrollado

HCC. No parece que los trastornos hepáticos no cancerosos o pre cancerosos den lugar a niveles séricos elevados de GP73.

- Por lo tanto la invención proporciona un método para diagnosticar HCC en un sujeto, que comprende determinar 5 los niveles séricos de GP73, un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, o ambos en un sujeto con respecto a los niveles séricos de GP73 o del polipéptido en un control. Los niveles séricos elevados de GP73, el polipéptido, o ambos en un sujeto indican que el sujeto padece HCC.

La invención también proporciona un método para monitorizar un sujeto en riesgo de desarrollar HCC, que comprende determinar los niveles séricos de GP73, un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, o ambos en el sujeto durante por lo menos dos momentos. Un aumento de la GP73 sérica, dicho polipéptido o ambos en el sujeto con respecto a los momentos anteriores indica que el sujeto ha desarrollado HCC. 10

## 15 Abreviaturas

En la presente memoria se utilizan las siguientes abreviaturas:

20	AFP:	alfa fetoproteína
	ALT:	alanina aminotransferasa ANOVA: análisis de la varianza
	AST:	asparagina transaminasa
25	AUROC:	área bajo una curva ROC
	ECL:	quimioluminiscencia potenciada
	ELISA:	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
30	GST:	glutation S transferasa
	HBV:	virus de la hepatitis B
35	HBsAg:	antígeno de superficie del HBV
	HCC:	carcinoma hepatocelular
	HVC:	virus de la hepatitis C
40	HIV:	virus de inmunodeficiencia humana
	MELD:	modelo para la puntuación del estadio terminal de la hepatopatía
45	RIA:	radioinmunoensayo
	ROC:	característica de funcionamiento del receptor
50	SDS-PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un análisis de inmunoelectrotransferecia de GP73 en pacientes infectados por HCV. El panel superior, marcado "GP73", muestra un análisis de inmunoelectrotransferecia con anticuerpo políclonal de conejo anti GP73 contra los siguientes: lisados de tejidos HCC (líneas 1 y 2; 25 µg/línea); lisado de tejido cirrótico (líneas 3 y 4; 25 µg/línea); y sueros (1 µl/línea) de los dos pacientes infectados por HCV con HCC (líneas 5 y 6). El panel inferior, marcado "actina", representa la misma membrana mostrada en el panel superior, tras ser desprendida y a continuación vuelta a examinar para la actina como control para la carga de proteínas. 55

Las Figuras 2A y 2B muestran los resultados de un análisis de inmunoelectrotransferecia con anticuerpo específico anti GP73 contra suero humano (0,5 µl) obtenidos a partir de sujetos humanos como sigue: HBV negativo (Grupo A); portador de HBV con infección inactiva (Grupo B); portador de HBV con infección activa (Grupo C); HCC asociado a HBV (Grupo D); HCV negativo (Grupo 1); infección por HCV crónica (Grupo 2); cirrosis relacionada con HCV (Grupo 3); y HCC relacionado con HCV (Grupo 4). Sobre cada línea se indica un número asignado a cada sujeto de estudio para fines de identificación. Se utilizaron sueros combinados, obtenidos comercialmente, de sujetos HCV, HIV, y HBV negativos (S) para los controles normales. 60 65

# ES 2 337 791 T3

Las Figuras 3A y 3B muestran los resultados de los análisis densométricos de las imágenes de inmunoelectrotransferencia de las Figuras 2A y 2B.

Las Figuras 4A y 4B muestran los resultados de un estudio que medía los niveles séricos de GP73 (Fig. 4A) y 5 los niveles séricos de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) (Fig. 4B) en pacientes con hepatopatía asociada a HCV y en pacientes de control. Los niveles de GP73 indicados se normalizan a los niveles de GP73 medidos en el suero de control (Sigma). Los niveles de AFP se describen como ng/ml de suero. Las barras de error representan el error estándar de la media.

10 Las Figuras 5A y 5B representan las curvas de Característica de Funcionamiento del Receptor (ROC) generadas en base a los datos de las Figuras 4A y 4B. El área bajo las curvas ROC (AUROC) para la GP73 y la AFP se indica en las inserciones.

## Descripción detallada de la invención

15 GP73 es una proteína de membrana del Golgi de tipo II de 400 aminoácidos de función desconocida, que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 73 kDa. Kladney *et al.*, 2.000, Gene 249, 53-65. La secuencia de aminoácidos deducida y nucleótidos de la GP73 se describe en Kladney *et al.*, 2.000, *supra*, y en GenBank con número de registro de entrada AF236056. El ADNc para la GP73 de longitud completa, que comprende 3.042 pares de bases 20 y contiene un único marco de lectura abierto de 1.200 pares de bases, se representa en la presente memoria como SEQ ID N°: 1. La secuencia de aminoácidos de GP73 se representa en la presente memoria como SEQ ID N°: 2.

25 Se ha descubierto recientemente que en los sueros de individuos con HCC existen cantidades apreciables de GP73 y un polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa + 5 kDa, que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73. El experto en la materia esperaría razonablemente que el polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa + 5 kDa, que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, fuese un fragmento de la GP73. Los individuos sin trastornos hepáticos o infecciones del hígado, o individuos con trastornos hepáticos pre cancerosos o no cancerosos, tienen poca o ninguna GP73 o el polipéptido anteriormente mencionado en sus sueros. La aparición de GP73 o del polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, en los sueros de individuos previamente diagnosticados con un trastorno hepático 30 pre canceroso o no canceroso indica que el trastorno hepático ha avanzado hasta el estado canceroso. En base a la caracterización inicial de la GP73 como una proteína transmembrana del Golgi residente, no se esperaba encontrar GP73 en la circulación, ni siquiera en sujetos con hígados lesionados o enfermos. A lo largo de la presente descripción, cualquier referencia a la GP73, como entidad molecular detectable, pretende incluir la proteína GP73 de longitud completa y el polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73.

35 De esta manera la invención proporciona un método para diagnosticar HCC en un sujeto del que se sospecha que padece HCC. El método de diagnóstico comprende determinar el nivel de GP73 o un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73 en una muestra de suero obtenida del sujeto, y 40 comparar los niveles de GP73 o polipéptido en esa muestra de suero con los niveles séricos de GP73 o polipéptido en un control. Un nivel elevado de GP73 o polipéptido en la muestra de suero del sujeto en comparación con el control indica que el sujeto padece HCC.

45 Un "nivel elevado" de GP73 en una muestra de suero de un sujeto en comparación con un control significa que la cantidad de proteína GP73 por unidad de volumen o unidad de masa es mayor en la muestra de suero del sujeto que en el control. El nivel de GP73 puede expresarse en unidades absolutas de masa de proteína por unidad de volumen o unidad de masa: *p. ej.*, como picogramos por microlitro. El nivel de GP73 también puede expresarse en unidades arbitrarias, como unidades de fluorescencia o densitométricas, según se determine con respecto a una muestra control. En los Ejemplos que se presentan más adelante, los niveles de GP73 se expresan en unidades densitométricas arbitrarias.

50 Aunque cualquier nivel elevado de GP73 puede ser predictivo de la enfermedad en la práctica de esta invención, preferentemente, el nivel de proteína GP73 en una muestra de suero de un sujeto es por lo menos 2 veces mayor, por ejemplo por lo menos 3 veces mayor, por lo menos 4 veces mayor, por lo menos 5 veces mayor, por lo menos 6 veces mayor, por lo menos 7 veces mayor, o por lo menos 8 veces mayor que el nivel de GP73 en el control.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "sujeto" es cualquier animal del que se sospecha que padece HCC. Preferentemente, el sujeto es un mamífero; por ejemplo ovino, bovino, porcino, equino, canino, felino, roedor o primate. Más preferentemente, el sujeto es un roedor, por ejemplo un ratón o rata. Todavía más preferentemente, el sujeto es un primate, por ejemplo un ser humano. En las formas de realización particularmente preferentes, el sujeto es un ser humano.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra de suero" es cualquier muestra biológica que comprenda suero. Se entiende que una muestra de suero para su uso en los presentes métodos puede contener otros componentes, en particular componentes sanguíneos. De esta manera, las muestras de sangre entera, o muestras de sangre que hayan sido separadas o fraccionadas sólo parcialmente pero que todavía contengan suero, se consideran "muestras de suero" 65 para los fines de la presente invención. Un experto en la materia puede obtener fácilmente muestras de suero, por ejemplo utilizando las técnicas convencionales de extracción de sangre. Además, la presencia de un conservante, anticoagulantes u otros productos químicos en la muestra de suero no debería inhibir la detección de la GP73. Tal como se utiliza en la presente memoria, "muestras de suero" también incluye los controles o muestras de control.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “control” o “muestra de control” se refiere a una o más muestras de suero tomadas de por lo menos un individuo que ha dado negativo para cualquier infección hepática, o que no padece HCC o ningún otro trastorno hepático. Preferentemente, la muestra de suero de control o control se obtiene de por lo menos un individuo que haya dado negativo para cualquier infección hepática, y que no padezca HCC o cualquier otro trastorno hepático. En las formas de realización particularmente preferentes, el control comprende muestras de suero obtenidas de una población de individuos que han dado negativo para cualquier infección hepática y que no padecen HCC o cualquier otro trastorno hepático. Se entiende que cuando el control comprende muestras de suero múltiples, el nivel sérico de GP73 puede expresarse como la media aritmética, mediana, moda u otra medida estadística adecuada del nivel de GP73 medido en cada muestra de suero. También pueden combinarse múltiples muestras de suero de control, y puede determinarse el nivel de GP73 de las muestras combinadas y compararse con la muestra de suero del sujeto.

Un experto en la materia puede obtener fácilmente muestras de suero de control, por ejemplo mediante técnicas convencionales de extracción de sangre u obteniendo muestras comerciales de suero que son de individuos que no padecen HCC o cualquier trastorno hepático. Las muestras comerciales de suero adecuadas para su uso como controles en los presentes métodos pueden obtenerse, por ejemplo, en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Puede utilizarse cualquier técnica adecuada para detectar los niveles séricos de GP73 con los presentes métodos, como por ejemplo una interacción biomolecular específica de GP73, que incluye pero no se limita a los ensayos basados en anticuerpos, ensayos basados en aptómeros, ensayos de receptor y ligando; ensayos de actividad enzimática, y ensayos de unión a reguladores alostéricos. Las técnicas para detectar las concentraciones de proteína en una muestra de suero se encuentran dentro del dominio del experto en la materia. Preferentemente, los niveles séricos de GP73 se detectan mediante inmunoensayos como la transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de quimioluminiscencia, o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los inmunoensayos adecuados para su uso en los presentes métodos se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. nºs 5.976.809; 5.965.379; 5.571.680; 5.279.956; y 6.579.684.

La detección de los niveles séricos de GP73 mediante transferencia Western se describe, por ejemplo, en Kladney *et al*, 2.002, Hepatology 35:1431-1440, y en los Ejemplos que se presentan más adelante.

El anticuerpo utilizado para detectar los niveles de GP73 en las muestras de suero puede comprender un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede comprender un anticuerpo intacto, o fragmentos de anticuerpo capaces de unirse específicamente a la proteína GP73. Tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>. De esta manera, tal como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. El término “anticuerpo” significa no sólo moléculas de anticuerpos intactos, sino que también incluye fragmentos de los mismos que conservan la capacidad de unión al antígeno.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales apropiados inmunizando a los animales huésped apropiados con proteína GP73 y recogiendo y purificando los antisueros de acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. La preparación de anticuerpos anti GP73 policlonales se describe, por ejemplo, en Kladney *et al*, 2.000, *supra*.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales siguiendo la técnica clásica de Kohler y Milstein, Nature 254, 493-497 (1.975), como se ha desarrollado adicionalmente en trabajos posteriores como Monoclonal Antibodies, -Hybridomas: A New Dimension in Biological Análisis, R.- H. Kennet *et al*, eds., Plenum Press, Nueva York y Londres (1.980).

Pueden detectarse los niveles séricos de GP73 mediante ensayos basados en aptómeros, que son muy similares a los ensayos basados en anticuerpos, pero con el uso de un aptómero en lugar de un anticuerpo. Además, un ensayo basado en aptómeros puede ser más amplio, en lo referente a que también pueden emplearse la amplificación de ácidos nucleicos (p. ej. PCR) y los ensayos de detección (p. ej., membranas de hibridación) en la detección de GP73. Un aptómero puede ser cualquier polinucleótido, generalmente un ARN o un ADN, que tiene una actividad biológica útil en términos de actividad bioquímica o atributos de reconocimiento molecular. Por lo general, un aptómero tiene una actividad molecular equivalente a tener una actividad enzimática o unirse a un polipéptido en una región específica (es decir, similar a un epitopo para un anticuerpo) del polipéptido. Es generalmente sabido en la técnica que un aptómero puede hacerse mediante métodos de selección *in vitro*.

Los métodos de selección *in vitro* incluyen un método bien conocido denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (a.k.a. SELEX). En resumen, la selección *in vitro* implica cribar un pool de polinucleótidos aleatorios en busca de un polinucleótido concreto que se une a una biomolécula, como un polipéptido, o tenga una actividad concreta que pueda seleccionarse. Generalmente, el polinucleótido concreto representa una fracción muy pequeña del pool, por lo tanto, se emplea una ronda de amplificación, habitualmente a través de la reacción de polimerización en cadena, para aumentar la representación de los aptómeros potencialmente útiles. Se emplean rondas sucesivas de selección y amplificación para aumentar exponencialmente la abundancia de un aptómero concreto. La selección *in vitro* se describe en Famulok, M.; Szostak, J. W., *In Vitro Selection of Specific Ligand Binding Nucleic Acids*, Angew. Chem. 1.992, 104, 1001. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1.992, 31, 979-988.); Famulok, M.; Szostak, J. W., Selection of Functional RNA and DNA Molecules from Randomized Sequences, Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 7, F. Eckstein, D. M. J. Lilley, Eds., Springer Verlag, Berlín, 1.993, pp. 271; Klug, S.; Farmulok, M., All

# ES 2 337 791 T3

you wanted to know about SELEX; Mol. Biol. Reports 1.994, 20, 97-107; y Burgstaller, P.; Famulok, M. Synthetic ribozymes and the first deoxyribozyme; Arsgew. Chem. 1.995, 107, 1303-1306 (Angew. Chem. Int. Ed Engl. 1.995, 34, 1189-1192), patente US Nº 6.287.765, patente U.S. Nº 6.180.348, patente U.S. Nº 6.001.570, patente U.S. Nº 5.861.588, patente U.S. Nº 5.56.588, patente U.S. Nº 5.475.096, y patente U.S. Nº 5.270.163.

5 La GP73 básicamente pura, que puede utilizarse como inmunógeno para elevar los anticuerpos monoclonales o policlonales, o como sustrato para seleccionar aptómeros, puede prepararse, por ejemplo, mediante métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, puede clonarse el ADNc de la SEQ ID NO:1 en un vector de expresión mediante técnicas dentro del dominio del experto en la materia. A continuación puede transfectarse un vector de expresión que 10 comprenda las secuencias que codifican la GP73 en un huésped apropiado, por ejemplo bacteriano, tras lo cual se expresa la GP73. A continuación la GP73 expresada puede aislarla mediante cualquier técnica adecuada.

Por ejemplo, la proteína GP73 puede prepararse en forma de una proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST) 15 expresada bacterialmente. Tales proteínas de fusión pueden prepararse utilizando sistemas de expresión disponibles comercialmente, siguiendo los protocolos de expresión estándar, p. ej., "Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins", suplemento 10, unidad 16.7, en Current Protocols in Molecular Biology (1.990) y Smith y Johnson, Gene 67: 34-40 (1.988); Frangioni y Neel, Anal. Biochem. 210: 179-187 (1.993).

En resumen, el ADN que codifica la GP73 (p. ej., SEQ ID NO:1) se subclona en un vector pGEX2T en el marco de 20 lectura correcto y se introduce en células de *E. coli*. Los transfectantes se seleccionan en placas de LB/penicilina tras su incubación durante 12 a 15 horas a 37°C. A continuación se cultivan los transfectantes seleccionados en cultivos líquidos en medio de crecimiento que contiene isopropil-β-D-tiogalactósido, para inducir la expresión de la proteína de fusión GP73. Se cosechan las células de los cultivos líquidos mediante centrifugación, se resuspende el pellet 25 bacteriano y se sonica para lisar las células.

Para aislar la proteína de fusión GST-GP73, a continuación se pone en contacto el lisado con perlas de glutatión-agarosa. Las perlas, que se unen a la proteína de fusión GST-GP73, se recogen mediante centrifugación y se eluye la 30 proteína de fusión GST-GP73. Las perlas de agarosa GST se eliminan mediante tratamiento de la proteína de fusión con trombina como tampón de división. La proteína GP73 liberada se recupera y se utiliza para elevar los anticuerpos descritos anteriormente.

Los anticuerpos contra la GP73 también pueden elevarse inmunizando apropiadamente a los huéspedes con fragmentos inmunogénicos de la proteína GP73 entera, en particular los péptidos correspondientes al extremo carboxilo terminal de la molécula. Los fragmentos de proteína GP73 pueden obtenerse mediante clivaje enzimático o químico 35 de la proteína GP73 aislada. De manera alternativa, los fragmentos de la proteína GP73 pueden obtenerse mediante síntesis química de sub-secuencias pequeñas (p. ej., 7-10 aminoácidos) de la SEQ ID NO:2.

Preferentemente, un anticuerpo anti GP73 para su uso en los presentes métodos comprende un marcador detectable. 40 El marcador detectable puede unirse directamente al anticuerpo anti GP73 primario. El marcador detectable también puede unirse indirectamente a un anticuerpo anti GP73 haciendo reaccionar el anticuerpo anti GP73 con un anticuerpo secundario, p. ej., una IgG anti conejo de cabra, que porta un marcador detectable.

El marcador detectable puede comprender, por ejemplo, un radionucleótido en el caso de un radioinmunoensayo; una fracción fluorescente en el caso de un ensayo de inmunofluorescencia; una fracción quimioluminiscente en el caso 45 de un ensayo de quimioluminiscencia; o una enzima que divisa un sustrato cromogénico, en el caso de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Los ensayos de interacciones biomoleculares para detectar niveles séricos de GP73 sólo requieren por lo general 50 muestras de suero muy pequeñas, por ejemplo del orden de los 0,5 microlitros. Se entiende, sin embargo, que puede utilizarse cualquier volumen de muestra de suero adecuada en los presentes métodos. También se entiende que la muestra de suero no necesita ser líquida, sino que puede comprender una muestra biológica seca (p. ej., liofilizada) que comprenda suero. Puede utilizarse cualquier cantidad de una muestra seca de suero en los presentes métodos.

55 La evaluación de los sujetos con infecciones crónicas por HBV y HCV, que incluyen aquellos con cirrosis del hígado, mostraron que los niveles de GP73 no se elevaban hasta un grado estadísticamente significativo en comparación con un control. Sin embargo, los niveles de GP73 en sujetos con HCC eran significativamente elevados. De esta manera, el ascenso de los niveles de GP73 en el suero de un sujeto que está en riesgo de HCC es un indicio de que el sujeto ha desarrollado HCC.

60 Por lo tanto la invención proporciona un método para monitorizar a un sujeto en riesgo de HCC, en el que los niveles de GP73 en el suero del sujeto se evalúan a lo largo del tiempo. Tal como se utiliza en la presente memoria, un sujeto "en riesgo de HCC" incluye sujetos que no han sido diagnosticados formalmente con HCC, pero que tienen una historia familiar de HCC, han contraído una infección por HBV o HCV o tienen una lesión hepática de cualquier etiología que puede avanzar hasta HCC.

En la práctica del método, las muestras de suero se obtienen del sujeto para por lo menos dos momentos. El nivel de GP73 en las muestras de suero se determina y compara uno con otro. Un nivel sérico elevado de GP73 en la muestra

# ES 2 337 791 T3

tomada en el momento posterior, respecto a la muestra del momento anterior, indica que el sujeto ha desarrollado HCC.

- Preferentemente, se toman una pluralidad de muestras de suero del sujeto a lo largo de varios meses a varios años.
- 5 Por ejemplo, las muestras de suero pueden tomarse cada 3 meses desde el momento que a un sujeto se le diagnostica una infección por HBV o HCV, hasta los 3, hasta los 5 o hasta los 10 años a lo largo de la infección vírica. Se entiende que las muestras de suero pueden tomarse a intervalos menores o mayores durante períodos de tiempo mayores o menores.
- 10 Un "nivel elevado" de GP73 en una muestra de suero de un sujeto tomada en un momento posterior, en comparación con la GP73 sérica en una muestra de suero de un sujeto tomada en un momento anterior, significa que la cantidad de proteína GP73 por unidad de volumen o unidad de masa es mayor en la muestra de suero posterior que en la muestra de suero anterior. El nivel de GP73 puede expresarse en unidades absolutas de masa de proteína por unidad de volumen o unidad de masa, o como unidades arbitrarias, como se ha comentado anteriormente.
- 15 Preferentemente, el nivel de proteína GP73 en la muestra de suero tomada en el momento posterior es por lo menos 2 veces mayor, por ejemplo por lo menos 3 veces mayor, por lo menos 4 veces mayor, por lo menos 5 veces mayor, por lo menos 6 veces mayor, por lo menos 7 veces mayor, por lo menos 8 veces mayor que el nivel de GP73 en la muestra de suero tomada en el momento anterior.
- 20 Las técnicas para obtener las muestras de suero, y para detectar los niveles de GP73, son como se han descrito anteriormente.

La práctica de la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

25

## Ejemplo 1

### *Detección de GP73 en suero de pacientes con carcinoma hepatocelular*

30

#### *Muestras de suero e historia de los pacientes*

35

Las muestras de suero se recogieron con el consentimiento informado de los participantes y de acuerdo con los procedimientos aprobados por los Comités Institucionales de Revisión del Fox Chase Cancer Center, universidad Thomas Jefferson, y universidad de Michigan, donde procediese. Estas muestras también se utilizaron en los ejemplos subsiguientes. Se incluyeron dos grupos de pacientes. Un grupo de pacientes de control e infectados por HBV estaba comprendido por 38 sujetos varones de origen étnico chino con una edad mínima de 35 años, que residían en los Estados Unidos en el momento de la recolección de las muestras. Debido a que estos pacientes pertenecen a una población donde el HBV es altamente endémico, es probable que todos fueran infectados durante la niñez o primera infancia. La infección por HBV se estableció en base a la positividad del antígeno de superficie del HBV (HBsAg) y en la detección de ADN de HBV en suero. El ADN de HBV se detectó mediante un método "dot blot" y tiene un límite de detección de sensibilidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  equivalentes de genoma por ml. (Evans *et al*, 1.998, Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention, 7:559-565). Se seleccionó un grupo de pacientes de control e infectados por HCV de los consultorios de hígado y de trasplante de hígado en el centro médico de la universidad de Michigan entre septiembre de 2.001 y mayo de 2.002. Se estableció el diagnóstico de infección por HCV mediante positividad del anticuerpo del HCV y la presencia de ARN de HCV en el suero. Se excluyeron los pacientes con causas no víricas de hepatopatía y aquellos con etiologías de la enfermedad múltiples. La presencia de hepatitis crónica, cirrosis, o HCC se estableció mediante examen histológico de biopsia de hígado o muestras de explantes. El diagnóstico de HCC se confirmó mediante visualización por ultrasonidos y biopsia. Las pruebas de función hepática (ALT o AST) se determinaron mediante inmunoensayo y el límite superior se consideró 50 IU/ml. Se aisló el suero a partir de muestras de sangre inmediatamente después de su recolección, y se almacenaron los alícuotas de suero a -80°C hasta los ensayos. Las muestras de sangre de los sujetos con HCC se extrajeron antes del inicio del tratamiento para el HCC.

55

A continuación se evaluó la expresión de GP73 en las muestras de suero recogidas consecutivamente de un grupo mayor de individuos infectados por HCV. El diagnóstico y la clasificación histológica se realizaron como se ha comentado anteriormente.

#### *Medición de la α-fetoproteína (AFP)*

60

Se midió la APF en las muestras de suero descritas anteriormente con inmunoensayos disponibles comercialmente utilizando quimioluminiscencia potenciada en el laboratorio de diagnósticos clínicos del hospital de la universidad de Michigan. El límite normal superior fue 8 ng/ml de AFP. Los datos demográficos y de laboratorio se obtuvieron para todos los pacientes. Se clasificó a los pacientes con HCC de acuerdo con el sistema de clasificación TNM de la UNOS.

65

#### *Análisis de inmunoelectrotransferencia y reactivos*

Se separaron volúmenes iguales de sueros de pacientes (0,5 ó 1,0 µl/línea) mediante SDS-PAGE en geles de gradiente de poliacrilamida al 4-20%. Para la normalización, algunos geles también incluían una línea que contenían 0,5

# ES 2 337 791 T3

$\mu$ l de suero de un pool de fuentes negativas para HCV y HBV (Sigma Inc., St. Louis, MO). Después de la separación electroforética, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF mediante inmunoelectrotransferencia. Se bloquearon las membranas mediante incubación en tampón de bloqueo (TBS 1x es 50 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM de cloruro de sodio, leche desnatada en polvo al 5%, y Tween 20 al 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

5 Se incubaron las membranas durante toda la noche con anticuerpo policlonal de conejo anti GP73 a una dilución de 1:1.000 en tampón de bloqueo con agitación suave a 4°C (Kladney, 2.000, Gene, *supra*). Se lavaron las membranas 2 veces en tampón de bloqueo a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo secundario anti conejo de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:4.000 v/v) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron las membranas 2 veces a temperatura ambiente en TBS-T 1x (TBS que contenía Tween 20 al 0,1%) y se desarrollaron utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL).

10

Se prepararon lisados de proteínas celulares totales de tejido hepático de muestras de HCC infectadas por HCV y tejido cirrótico infectado por HCV como se ha descrito anteriormente (Kladney *et al*, 2.002, Hepatology 35:1431-1440). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). Se fraccionaron 15 veinticinco  $\mu$ g de lisados de proteínas celulares totales de tejido hepático de pacientes infectados por HCV con cirrosis o HCC mediante SDS-PAGE en geles de gradiente de poliacrilamida al 4-20% y se sometieron a una inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales de conejo anti GP73 como se ha descrito anteriormente. Estas técnicas se utilizaron también en los ejemplos subsiguientes.

## 20 Resultados

Se compararon los niveles de GP73 en pacientes infectados por HCV que también padecían cirrosis o HCC. Los resultados se muestran en la Figura 1. Las líneas 1 y 2 son lisados de tejido HCC. Las líneas 3 y 4 son lisados de tejido cirrótico. Las líneas 5 y 6 son sueros de los dos pacientes infectados por HCV con HCC.

25 La GP73 resultó claramente detectable en los sueros de los dos pacientes infectados por HCV (Fig. 1 líneas 5 y 6). Además, se detectaron niveles más altos de GP73 en los lisados de células obtenidos a partir de material de biopsia de hígado de pacientes HCV con HCC, en comparación con los pacientes HCV con cirrosis (Fig. 1, líneas 1-4).

30 Además de una banda de aproximadamente 73 kDa (Daltons  $\times 10^3$ ) en la membrana de Western, que representa una proteína GP73, se detectó una banda de aproximadamente 25 kDa  $\pm$  5 kDa, que puede decirse que es un fragmento de GP73, en los sueros de pacientes con HCC y pacientes con HCV, pero no en los sueros de individuos de control normales.

## 35 Ejemplo 2

### Detección de GP73 en suero de pacientes con carcinoma hepatocelular

#### 40 Métodos

Se obtuvieron las muestras de suero, y se llevaron a cabo las inmunoelectrotransferencias, como se ha descrito anteriormente. Se llevaron a cabo los análisis densitométricos de los inmunoblot para cuantificar las cantidades de proteína GP73 en los sueros de los pacientes, con respecto a la señal presente en el suero de control Sigma. Se puso la señal para el suero de control Sigma a un valor de 1,0.

45 Las señales específicas de GP73 de las especies de 73 kDa se cuantificaron a partir de la película de rayos X utilizando una cámara CCD FluorChem Alpha Innotech con software de densitometría de *spots* AlphaEase, y se expresaron como unidades de intensidad integradas con respecto a la señal de GP73 detectada en el suero de control Sigma (línea S en cada membrana). Se calcularon los valores como la media de las determinaciones duplicadas o triplicadas para cada muestra de suero y resultados.

50 Se obtuvieron alícuotas de suero humano ( $0,5 \mu$ l) de los sujetos de estudio HBV siguientes: HBV negativo (Grupo A); portador HBV con infección inactiva (Grupo B); portador HBV con infección activa (Grupo C); HCC asociada a HBV (Grupo D). Se obtuvieron alícuotas de suero humano ( $0,5 \mu$ l) de los sujetos de estudio HCV siguientes: HCV negativo (Grupo 1); infección por HCV crónica (Grupo 2); cirrosis relacionada con HCV (Grupo 3); HCC relacionada con HCV (Grupo 4). Se identificaron las muestras mediante SDS-PAGE en geles de gradiente de poliacrilamida al 4-20% y se sometieron a inmunoelectrotransferencia con anticuerpo específico anti GP73. Se utilizaron sueros combinados, obtenidos comercialmente, de sujetos HCV, HIV y HBV negativos (S) para los controles normales. En 60 las Tablas 1 (pacientes HBV) y 2 (pacientes HCV) más adelante, se resumen los perfiles serológicos y demográficos de los sujetos de control y pacientes.

#### Resultados

65 Se compararon los niveles de GP73 en los sueros de los pacientes infectados por HBV con o sin HCC con los niveles de GP73 en los sueros de los pacientes infectados por HCV con o sin HCC, y con los niveles de GP73 en los sujetos de control. Los resultados se muestran en las Figuras 2A y 2B. El número asignado a cada sujeto de estudio con fines de identificación se indica sobre cada línea.

# ES 2 337 791 T3

Se encontraron altos niveles de GP73 en los sueros de 23 de los 24 pacientes con HCC relacionada con HBV o HCV crónica, pero no en los individuos sanos sin hepatitis vírica. También estuvieron presentes niveles de suero elevados en un subconjunto de pacientes con cirrosis hepática sin HCC (Figs. 2A y 2B). Se detectaron niveles bajos de GP73 en la circulación de los individuos no infectados, similares a los niveles observados en el suero de control (S).

5 Se llevaron a cabo análisis densitométricos de los inmunoblot de las Figs. 2A y 2B como se ha descrito anteriormente para cuantificar las cantidades de proteína GP73 en los sueros de los pacientes, con respecto a la señal presente en el suero de control Sigma. Los resultados de los análisis densitométricos se muestran gráficamente en las Figs. 3A y 3B.

10 El análisis estadístico de la Fig. 3A muestra que la única diferencia significativa se da entre el Grupo D (pacientes HCC) frente a los Grupos A, B, y C,  $p < 0,001$ . El análisis estadístico de los pacientes HCV y los controles, como se indica en la Fig. 3B, muestra que la única diferencia significativa se da entre el Grupo 4 (pacientes HCC) frente a los Grupos 1, 2, y 3,  $p < 0,001$ .

15 Unos pocos individuos con enfermedad hepática no maligna asociada a HBV ó HCV tenían niveles algo elevados de GP73 en los sueros, mientras que los niveles más altos se encontraron en pacientes con un diagnóstico de HCC (Fig. 3A y 3B). Siete de los ocho individuos con HCC asociada a HBV mostraron un aumento mayor que cualquier paciente en los otros tres grupos (Fig. 2A, Grupo D y Fig. 3A). Once de los diecisésis individuos con HCC asociada a HCV mostraron niveles de GP73 más altos que cualquier paciente en los demás grupos de ese grupo experimental (Fig. 2B, Grupo 4, Fig. 3B).

20 Los análisis estadísticos revelaron un aumento global estadísticamente significativo de los niveles séricos de GP73 en los pacientes con HCC, en comparación con todos los demás grupos diagnósticos,  $p < 0,001$  (Fig. 3). El análisis de la varianza (ANOVA) de acuerdo con la infección por HBV o HCV indicó que esta diferencia se encontraba presente independientemente del agente vírico. Para cada grupo, se rechazó la hipótesis nula de no diferencia entre los cuatro grupos de sujetos (para el grupo HBV,  $F = 49,47$ ,  $p < 0,0001$ , para el grupo HCV,  $F = 17,51$ ,  $p < 0,0001$ ). En los ensayos de comparación por paresajustados para múltiples comparaciones, se compararon las medias para cada uno de los grupos. En análisis separados de los conjuntos de datos HBV y HCV, el grupo HCC difirió significativamente de cada uno de los otros tres grupos ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, los tres grupos no HCC no resultaron significativamente diferentes uno del otro. Sin desear restringirse a ninguna teoría particular, estos resultados indican que la aparición de niveles altos de GP73 circulante puede ser una característica del cáncer hepatocelular inducido por virus, independientemente de la etiología vírica de la hepatitis (HBV ó HCV).

35 TABLA 1

*Perfiles serológicos y demográficos de los pacientes HBV de los sujetos de los Grupos A-D*

40	Grupo	Diagnóstico	Perfil serológico <sup>1</sup>	Número y género de los pacientes <sup>2</sup>	Edad (media ± S.D.)
45	A	HBV negativo	HBsAg – ADN HBV - LFTs normales	7 (7V)	$60,1 \pm 5,3$
50	B	Portador HBV, inactivo	HBsAg + ADN HBV - LFTs normales	11(11V)	$52,6 \pm 11,4$
55	C	Portador HBV, activo	HBsAg + ADN HBV + LFTs anormales	12(12V)	$55,1 \pm 9,0$
60	D	HCC-HBV	HBsAg +	8 (8V)	$57,1 \pm 8,8$

<sup>1</sup>LFT = test de function hepatica  
<sup>2</sup>V = varón

# ES 2 337 791 T3

TABLA 2

*Perfiles serológicos y demográficos de los pacientes HCV de los sujetos de los Grupos 1-4*

<b>Grupo</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Perfil serológico</b>	<b>Número y género de los pacientes <sup>1</sup></b>	<b>Edad (media ± S.D.)</b>
1	HCV negativo	HCV Ab (-), ARN-HCV (-)	16 (4V, 12H)	41 ± 13
2	HCV crónico	HCV Ab (+), ARN-HCV (+)	16 (7V, 9H)	45 ± 6,5
3	HCV + cirrosis	HCV Ab (+), ARN-HCV (+)	16 (10V, 6H)	49 ± 6,6
4	HCV + HCC	HCV Ab (+), ARN-HCV (+)	16 (14V, 2H)	56 ± 12,4
<sup>1</sup> V = varón, H = hembra				

## 25 Ejemplo 3

### *Comparación de AFP y GP73 sérica en la detección de HCC*

30 En base a los resultados obtenidos en el Ejemplo 2, se llevó a cabo un estudio a ciegas más amplio, enfocándose en una cohorte infectada por HCV bien caracterizada (n=142). Se midieron los niveles de GP73 y AFP en sueros de pacientes con hepatopatía asociada a HCV y pacientes de control. Los grupos de pacientes y perfiles demográficos se definen en la Tabla 3.

TABLA 3

*Perfil demográfico de la cohorte mayor de pacientes con Hepatitis C*

<b>Variable</b>	<b>Normal (n=40)</b>	<b>Hepatitis Crónica (n=35)</b>	<b>Cirrosis (n=35)</b>	<b>HCC (n=33)</b>	<b>Valor de P</b>
Edad	51 ± 9,7	54 ± 6	51 ± 8	51 ± 10	0,14
Género (V:H)	30:10	20:14	16:9	28:5	0,32
AFP (ng/ml)	2,94 ± 1,6	10,8 ± 23	19,7 ± 38	11.788 ± 60.359	<0,001
%<20	100	88	77	55	
%20-200	0	12	23	24	
%>200	0	0	0	21	
LAT (IU/ml)	28,6 ± 9	67 ± 41	112 ± 124	81 ± 49	<0,001*
AST (IU/ml)	22 ± 5	53 ± 36	94 ± 85	109 ± 56	0,003*
Bilirrubina (mg/dl)	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,9	0,13
Puntuación MELD	5 ± 0,2	6,1 ± 0,4	7,8 ± 1,8	8,3 ± 2,1	0,03*
% Estado TNM (I/II/III/IV)	NA	NA	NA	9/12/6/6	

\*Grupo 3 frente a 1 y 2. \*Grupo 4 frente a 1 y 2. NA = no aplicable

### Métodos

Las inmunoelectrotransferencias y los análisis densitométricos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

5

### Análisis Estadístico

Se utilizó la transformación Log en los valores AFP para considerar el rango amplio de valores. Los datos estadísticos descriptivos para la AFP y GP73 se compararon mediante diagramas de cajas y a continuación mediante ANOVA.

- 10 Se sometieron a ensayo las diferencias de los grupos en las medias utilizando el procedimiento GLM de SAS V 8.01 (Instituto SAS, Cary, NC) para el análisis de la varianza, que utiliza el método de los mínimos cuadrados para ajustar los modelos lineales generales, para las variables continuas. Para las variables binarias, se utilizó un chi cuadrado para comparar los grupos. Para poder abordar las múltiples comparaciones, se ajustaron los valores de p para las medias individuales dentro de los ANOVAs utilizando el test de Tukey-Kramer. Para determinar el valor del *límite* óptimo para GP73 y AFP en el diagnóstico de HCC, se construyeron curvas de característica de funcionamiento del receptor (ROC) utilizando todos los posibles *límites* para cada ensayo. Se calcularon y compararon las áreas bajo las curvas ROC (AUROC) como se ha descrito anteriormente (Griner *et al*, 1.981, Ann. Intern. Med. 94:555-600; Metz, 1.998, Semin-Nucl. Med. 8:283-298). Se supuso una distribución normal bi-variente para los dos marcadores. Se utilizó un valor de p de 2 colas <0,05 para determinar la significancia estadística. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando SAS (Cary, NC, EE.UU).

- 15 20 25 Se utilizó una inmunoelectrotransferencia para detectar y cuantificar los niveles de GP73 en los sueros. Para los análisis estadísticos, se separaron los sujetos en cuatro categorías, al igual que antes: controles normales (no infectados por HBV o HCV), HCV crónicos sin cirrosis, HCV crónicos con cirrosis, y HCV crónicos con cirrosis y HCC. Los grupos son parejos en cuanto a edad, género, y etnicidad (véase Tabla 3).

### Resultados

- 30 Los resultados (Fig. 4A) mostraron un aumento estadísticamente significativo de la GP73 sérica en los pacientes diagnosticados con HCC, en comparación con los grupos de hepatopatía no maligna o control (ANOVA, p < 0,001). Las frecuencias de aumento de la GP73 (Fig. 4A) se compararon con los aumentos de la AFP en los pacientes de esta población (Fig. 4B). Los niveles de AFP se determinaron mediante ensayos clínicos estándar como se ha descrito anteriormente. Aunque los niveles de AFP aumentaron en general en los pacientes con HCC, no pudo demostrarse ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de AFP entre los pacientes HCC y los demás grupos en este análisis (ANOVA, p = 0,292).

- 35 40 45 También se llevó a cabo un análisis de curvas ROC para comparar la sensibilidad y la especificidad de la GP73 y AFP a la hora de distinguir los pacientes con cirrosis de aquellos con cirrosis más HCC en esta población de individuos infectados crónicamente por HCV. Los datos deducidos para los Grupos 3 y 4 en la Figura 4 se dibujaron para el análisis ROC, y se presentan en la Figura 5. Las curvas ROC muestran que los niveles de GP73 resultan más predictivos que la AFP como indicador de HCC. La GP73 tiene una sensibilidad de 0,85 y una especificidad de 0,65, mientras que la AFP es menor tanto en sensibilidad (0,70) como especificidad (0,60). En base al ensayo utilizado, se determinó que el valor del *límite* óptimo para la GP73 era 8,4 unidades relativas superior a la señal de GP73 de la muestra control, y el valor del *límite* óptimo para la AFP era de 9,9 ng/ml. P = 0,149 para la diferencia entre AFP y GP73.

- 50 Sin desear restringirse a ninguna teoría particular, estos estudios indican que los niveles séricos de GP73 pueden resultar más predictivos que la AFP para distinguir entre un diagnóstico clínico de HCC y una hepatopatía no maligna asociada con una infección por HBV o HCV.

- Por lo tanto, la presente invención no debería limitarse a ninguna forma de realización única, sino más bien debería interpretarse en amplitud y alcance de acuerdo con la descripción de las reivindicaciones adjuntas.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Método para diagnosticar HCC (carcinoma hepatocelular) en un sujeto, que comprende:

- (1) determinar el nivel de GP73 o de un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, en una muestra de suero obtenida de un sujeto del que se sospecha que padece HCC; y
- (2) comparar el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero con los niveles séricos de GP73 o dicho polipéptido en un control, en el que los niveles elevados de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero con respecto al control indican que el sujeto padece HCC.

2. Método para monitorizar un sujeto en riesgo de desarrollar HCC (carcinoma hepatocelular), que comprende:

determinar los niveles de GP73 o de un polipéptido de 25 kDa +/- 5 kDa que presenta reacción cruzada con un anticuerpo específico de GP73, en por lo menos una primera muestra de suero obtenida de un sujeto en un primer momento y por lo menos una segunda muestra de suero obtenida del sujeto en un segundo momento, en el que un aumento del nivel de GP73 o dicho polipéptido en la segunda muestra de suero con respecto al nivel de GP73 o dicho polipéptido en la primera muestra de suero indica que el sujeto ha desarrollado HCC.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero con respecto al nivel de GP73 o dicho polipéptido en el control, o el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la segunda muestra de suero con respecto al nivel en la primera muestra de suero, se eleva por lo menos 2 veces.

4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero con respecto al nivel de GP73 o dicho polipéptido en el control, o el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la segunda muestra de suero con respecto al nivel en la primera muestra de suero, se eleva por lo menos 3 veces.

5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero con respecto al nivel de GP73 o dicho polipéptido en el control, o el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la segunda muestra de suero con respecto al nivel en la primera muestra de suero, se eleva por lo menos 6 veces.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en la muestra de suero se detecta mediante un ensayo de interacción biomolecular.

7. Método según la reivindicación 6, en el que el ensayo de interacción biomolecular es un inmunoensayo.

8. Método según la reivindicación 7, en el que los inmunoensayos se seleccionan del grupo que consiste en una transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de quimioluminiscencia, o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en una muestra de suero se detecta mediante un aptómero.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de GP73 o dicho polipéptido en una muestra de suero se detecta mediante un anticuerpo.

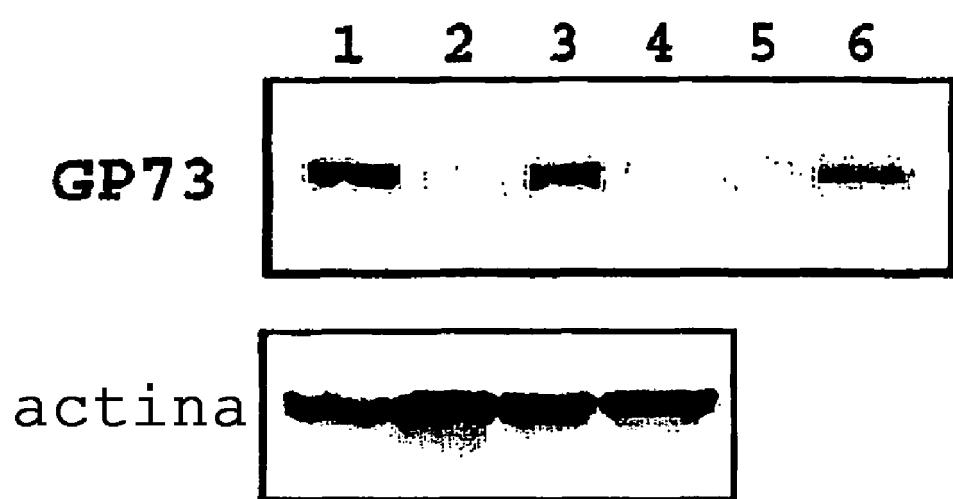
11. Método según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo comprende un anticuerpo anti GP73 monoclonal o policlonal.

12. Método según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo comprende un fragmento de anticuerpo.

55

60

65



**FIG. 1**

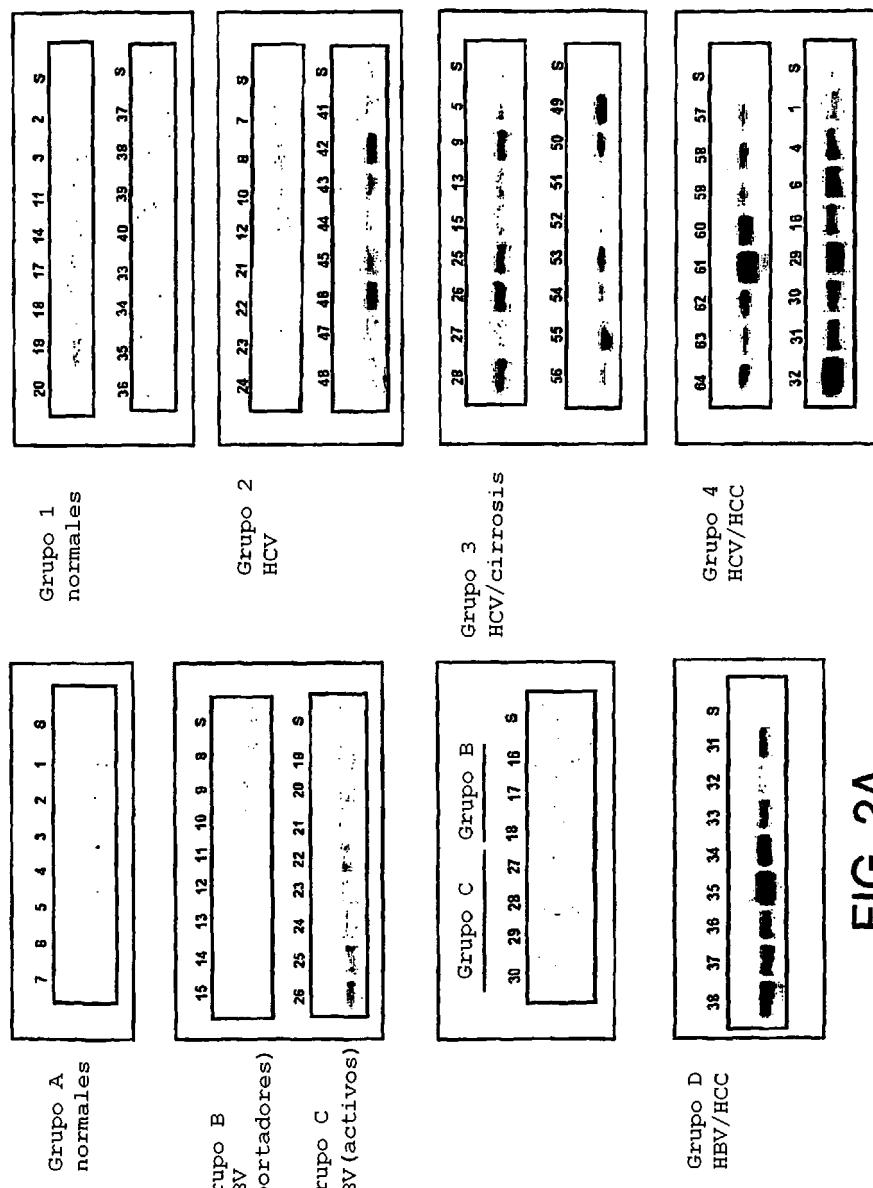


FIG. 2A

FIG. 2B

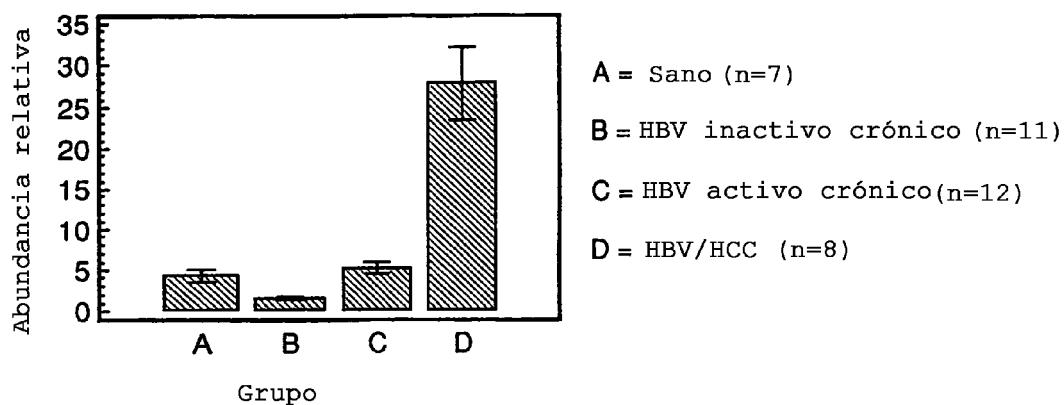


FIG. 3A

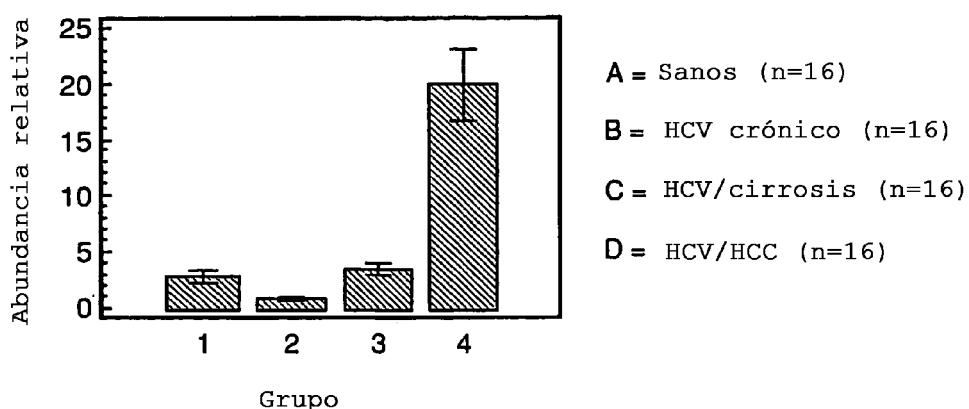
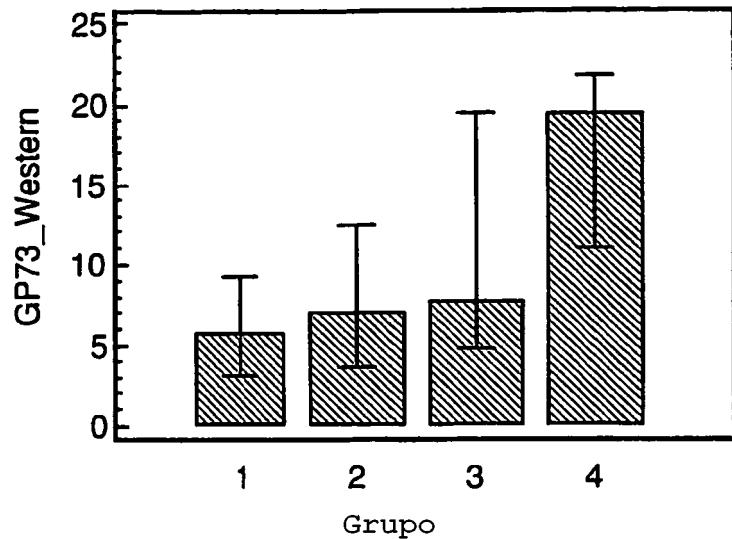


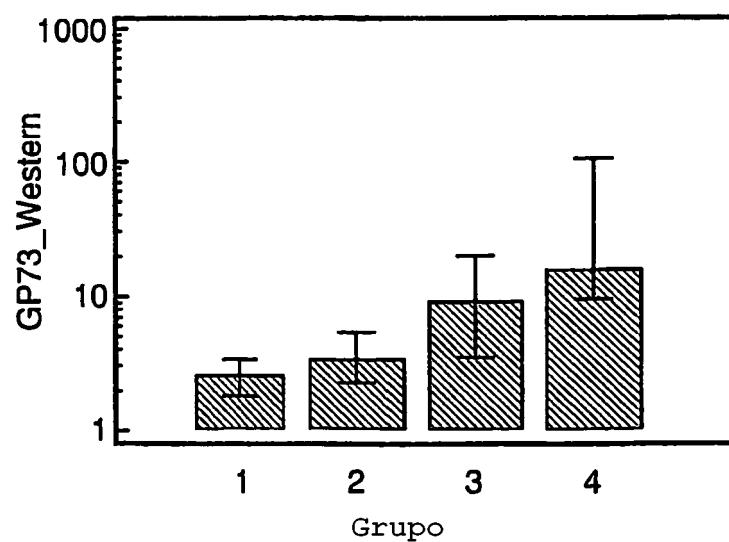
FIG. 3B

**GP73**

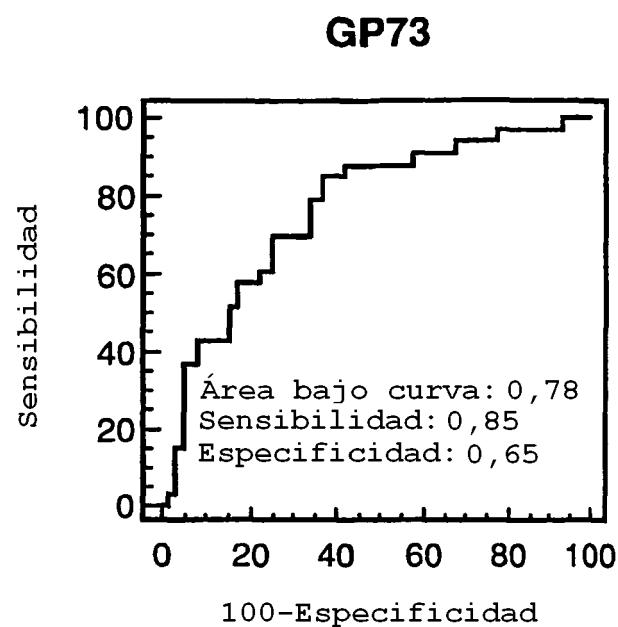


**FIG. 4A**

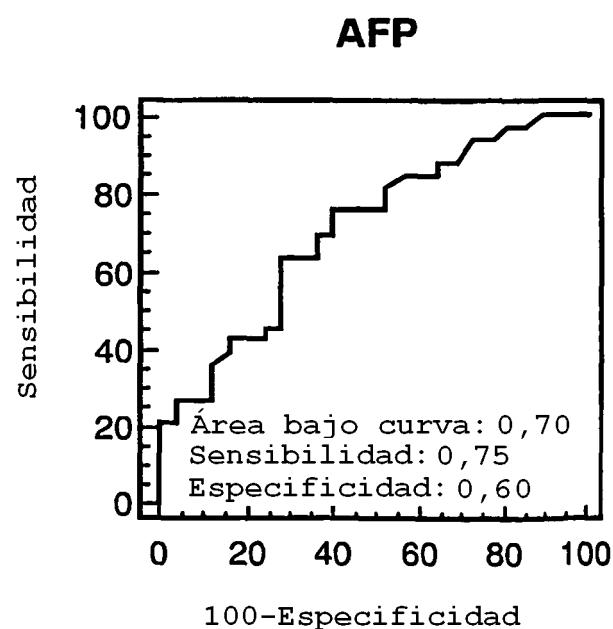
**AFP**



**FIG. 4B**



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**

# ES 2 337 791 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD THOMAS JEFFERSON  
UNIVERSIDAD DE SAINT LOUIS  
5 LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA representado por el DEPARTAMENTO DE ASUNTOS DE LOS  
VETERANOS  
Patrick R. Romano  
Timothy M. Block  
10 Claus J. Fimmel  
Olga Nikolaeva

<120> DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR  
15 <130> 08321-141PC1  
  
<150> 60/500,657  
20 <151> 2003-09-05  
  
<160> 2  
  
<170> FastSEQ para windows versión 4.0  
25 <210> 1  
<211> 3042  
<212> ADN  
30 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 1  
  
35           cggaggcgct gggcgcacgg cgcgaggccg gccggagctc gaggccggcg gcggcgggag 60  
      agcgcacccgg gcggcctcggt agcggggccc cggatccccg agtggcgggcc ggaggcctcg 120  
      aaagagatttc tcagcgctga ttttgagatg atgggcttgg gaaacgggccc tcgcagcatg 180  
      aagtccgcgc ccctcgtctgct ggccgcctgg gtggcctgca tcacgtctt gggcttcaac 240  
      tactggattt cgagctcccg gagcgtggac ctccagacac ggatcatgaa gctgaaaggc 300  
      agggtccgca gggcggtctgc agagagaggc gccgtggagc tgaagaagaa cgagttccag 360  
      ggagagctgg aqaagcagcg ggagcagctt gacaaaatcc agtccagcca caacttccag 420  
      ctggagagcg tcaacaagct gtaccagac gaaaaggcgg ttttggtcaa taacatcacc 480  
      acagggtgaga ggctcatccg agtgcgtcaa gaccagttaa gagacctgtca gaggaaattac 540  
      ggcaggctgc agcaggatgt cctccagttt cagaagaacc agaccaacct ggagaggaag 600  
      ttctcctacg acctgagcca gtgcataaat cagatgaagg aggtgaagga acagtgttag 660  
      gagcgaatag aagaggtcac caaaaagggg aatgaagctg tagcttccag agacctgagt 720  
      gaaaacaacg accagagaca gcagctccaa gcctcgtgt agcctcagcc caggctgcag 780  
      gcagcaggcc tgccacacac agagggtgca caagggaagg gaaacgtct tggttaacagc 840  
      aagtcccaaga caccagcccc cagttccgaa gtgttttgg attcaaaagag acaagtttag 900  
      aaagagaaaa ccaatgagat ccagggtgtt aatgaggagc ctcaagggaa caggctgcgg 960  
      caggagccag gcccgggagca ggtgttggaa gacagacctg tagtgtggaa aggcttcggg 1020  
      ggagccggag aactgggcca gaccccacag gtgcaggctg ccctgtcaat gagccaggaa 1080  
      aatccagaga tggagggccc tgagcgagac cagcttgtca tccccgacgg acaggaggag 1140  
      gagcaggaaag ctggggggggg agggggaaaac cagcagaaac tgagggaga agatgactac 1200  
      aacatggatg aaaatgaagc agaatcttag acagacaagc aagcggccct ggcaggaaat 1260  
      gacagaaaaca tagatgtttt taatgttcaa gatcagaaaa gacacccat aaatttactt 1320  
      gatcagctg aaaagcggaa tcatacactc tgaattgaaat tggaatcaca tatttcacaa 1380  
      cagggccgaa gagatgacta taaaatttt atgaggact gaatactgaa aactgtgaaa 1440  
      tgtactaaat aaaatgtaca tctgaagatg attattgtga aatttttagt tgcaacttgt 1500  
      gttagaaaaaa atggaaatggt cttttaaaca gctttttggg ggttacttg gaagtgtcta 1560  
      ataaggtgtc acaatttttt gttagtaggtt ttctgtgaga atttcaacac caaaacttgg 1620  
      acatgttct cttcaagtgtt ttggcgtacag cggggcttcc tgattctgaa atataacttt 1680  
      gtgtaaaatta acagccaccc atagaagagt ccattctgtc tgaaggagag acagagaact 1740  
      ctgggttccg tcgtcctgtc cacgtgtgtt accaagtgtc ggtgccagcc tgttacctgt 1800  
      tctcaactgaa aagtctggct aatgtcttgc tgtagtcaact tctgattctg acaatcaatc 1860  
      aatcaatggc ctagagcact gactgttaac acaaaacgtca ctagcaaagt agcaacagct 1920  
      ttaatgtctaa atacaatggctt gttctgtgtt agaattttttaaaaaggctac ttgtataata 1980  
      acccttgcata tttttaaatgtt acaaaaacgtt attaagtggc tttagaatttg aacatttgg 2040  
      gtctttatgtt actttgcctt gtgtgtggc aaagcaacat cttccctaaa tatatattac 2100  
      caagaaaagc aagaagcaga tttagttttt gacaaaacaa acaggccaaa agggggctga 2160  
      cctggagcag agcatgggtga gaggcaaggc atgagaggc aagtttgtg tggacagatc 2220  
      tgtgcctact ttattactgg agtaaaagaa aacaaagtcc attgtatgtc aaggatataat 2280

## ES 2 337 791 T3

	acagtgttag	aaattaggac	tgttttagaaa	aacaggaata	caatgggttgc	tttttatcata	2340
5	gtgtacacat	ttagcttgc	gttaaatgact	cacaaaactg	atttaaaat	caagttaatg	2400
	tgaattttga	aaatttactac	ttaatcccaa	ttcacaataa	caatggcatt	aaggtttgac	2460
	tttagtttgt	tcttagtatt	atttatggta	aataggtct	taccacttgc	aaataactgg	2520
	ccacatcatt	aatgactgac	ttcccgat	ggctctcaa	gggttaagta	ggaggatcca	2580
	caggatttga	gatgctaagg	ccccagagat	cgtttgatcc	aaccctctta	tttcagagg	2640
	gaaaaatggg	gcctagaagt	tacagagcat	ctagctgtg	cgctggcacc	cctggccctca	2700
	cacagactcc	cgagtagctg	ggactacagg	cacacagtca	ctgaagcagg	ccctgttgc	2760
	aattcacgtt	gccaccccca	acttaaacat	tcttcatatg	tgtatgtcctt	agtcaactaag	2820
10	gtttaacttt	cccacccaga	aaaggcaact	tagataaaaat	cttagagtac	tttcataactc	2880
	tcttaagtcc	tcttccagcc	tcacttttag	tcctccctgg	ggttgatagg	aattttctct	2940
	tgcrrrctca	ataaaagtctc	tattcatctc	atgtttaatt	tgtacgcata	gaatttgctga	3000
	gaaataaaaat	gttctgttca	acttaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa		3042

20 &lt;210&gt; 2

15 &lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

20 &lt;400&gt; 2

	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Gly	Arg	Arg	Ser	Met	Lys	Ser	Pro	Pro	Leu	Val
	1									10						15
	Leu	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Cys	Ile	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Trp
25										20						30
	Ile	Ala	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Asp	Leu	Gln	Thr	Arg	Ile	Met	Glu	Leu
										35						45
	Glu	Gly	Arg	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Leu
30										50						60
	Lys	Lys	Asn	Glu	Phe	Gln	Gly	Glu	Leu	Glu	Lys	Gln	Arg	Glu	Gln	Leu
									65							80
	Asp	Lys	Ile	Gln	Ser	Ser	His	Asn	Phe	Gln	Leu	Glu	Ser	Val	Asn	Lys
40									85							95
	Leu	Tyr	Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly
									100							110
45	Glu	Arg	Leu	Ile	Arg	Val	Leu	Gln	Asp	Gln	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Arg
									115							125
	Asn	Tyr	Gly	Arg	Leu	Gln	Gln	Asp	val	Leu	Gln	Phe	Gln	Lys	Asn	Gln
50									130							140
	Thr	Asn	Leu	Glu	Arg	Lys	Phe	Ser	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Cys	Ile	Asn
									145							160
55	Gln	Met	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Gln	Cys	Glu	Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Val
									165							175
	Thr	Lys	Lys	Gly	Asn	Glu	Ala	Val	Ala	Ser	Arg	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn
60									180							190
	Asn	Asp	Gln	Arg	Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Pro	Gln	Pro	Arg
65									195							205
	Leu	Gln	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	His	Thr	Glu	Val	Pro	Gln	Gly	Lys	Gly
									210							220
	Asn	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Ala	Pro	Ser	Ser	Glu
									225							240
	Val	Val	Leu	Asp	Ser	Lys	Arg	Gln	Val	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Asn	Glu
									245							255
	Ile	Gln	Val	Val	Asn	Glu	Glu	Pro	Gln	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Gln	Glu
									260							270
	Pro	Gly	Arg	Glu	Gln	Val	Val	Glu	Asp	Arg	Pro	Val	Gly	Gly	Arg	Gly
									275							285
	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Gln	Ala	Ala
									290							300
	Leu	Ser	Val	Ser	Gln	Glu	Asn	Pro	Glu	Met	Glu	Gly	Pro	Glu	Arg	Asp
									305							320
	Gln	Leu	Val	Ile	Pro	Asp	Gly	Gln	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Gly	
60									310							
	Glu	Gly	Arg	Asn	Gln	Gln	Lys	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Asp	Tyr	Asn	Met
									325							335
	Asp	Glu	Asn	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu	Thr	Asp	Lys	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala
									340							350
	Gly	Asn	Asp	Arg	Asn	Ile	Asp	Val	Phe	Asn	Val	Glu	Asp	Gln	Lys	Arg
65									355							365
	Asp	Thr	Ile	Asn	Leu	Leu	Asp	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg	Asn	His	Thr	Leu
									385							400
									390							