



19



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**

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

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

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**

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

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 período 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 prognosis 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 prognosis 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 multinucleados. 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 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.

## 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
30	ELISA:	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
	GST:	glutathione S transferasa
	HBV:	virus de la hepatitis B
35	HBsAg:	antígeno de superficie del HBV
	HCC:	carcinoma hepatocelular
40	HVC:	virus de la hepatitis C
	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 inmunoelectrotransferencia de GP73 en pacientes infectados por HCV. El panel superior, marcado "GP73", muestra un análisis de inmunoelectrotransferencia con anticuerpo policlonal 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.

Las Figuras 2A y 2B muestran los resultados de un análisis de inmunoelectrotransferencia 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.

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 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.

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

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 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.

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 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.

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 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.

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.

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.

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.

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” 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. n.ºs 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 antiseros 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 Analysis, 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 epítipo 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 una 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.; Famulok, M., All

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 N° 6.287.765, patente U.S. N° 6.180.348, patente U.S. N° 6.001.570, patente U.S. N° 5.861.588, patente U.S. N° 5.56.588, patente U.S. N° 5.475.096, y patente U.S. N° 5.270.163.

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 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 aislarse mediante cualquier técnica adecuada.

Por ejemplo, la proteína GP73 puede prepararse en forma de una proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST) expresada bacteriamente. 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 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- $\beta$ -D-tiogalactósido, para inducir la expresión de la proteína de fusión GP73. Se cosechan las células a de los cultivos líquidos mediante centrifugación, se resuspende el pellet 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 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 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. 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 de un ensayo de quimioluminiscencia; o una enzima que divide 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 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.

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.

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

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. 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.

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.

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.

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.

#### Ejemplo 1

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

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

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 de 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.

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 $\alpha$ -fetoproteína (AFP)*

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.

##### *Análisis de inmunoelectrotransferencia y reactivos*

Se separaron volúmenes iguales de sueros de pacientes (0,5 ó 1,0  $\mu$ l/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

$\mu$ 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.

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).

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 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.

## 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.

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).

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 fragmente de GP73, en los sueros de pacientes con HCC y pacientes con HCV, pero no en los sueros de individuos de control normales.

## Ejemplo 2

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

## 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 inmunoblots 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.

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.

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 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

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.



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).

Se llevaron a cabo análisis densitométricos de los inmunoblots 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.

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,  $p < 0,001$ .

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 dieciséis 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).

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 pares ajustados 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).

TABLA 1

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

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

Grupo	Diagnóstico	Perfil serológico	Número y género de los pacientes <sup>1</sup>	Edad (media ± S.D.)
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*

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*

Variable	Normal (n=40)	Hepatitis Crónica (n=35)	Cirrosis (n=35)	HCC (n=33)	Valor de P
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 <sup>#</sup>
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	
<sup>#</sup> Grupo 3 frente a 1 y 2. *Grupo 4 frente a 1 y 2. NA = no aplicable					

## Métodos

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

## 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. 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-variante 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).

Se utilizó una inmunoelctrotransferencia 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

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,  $p = 0,292$ ).

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.

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.

## 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.

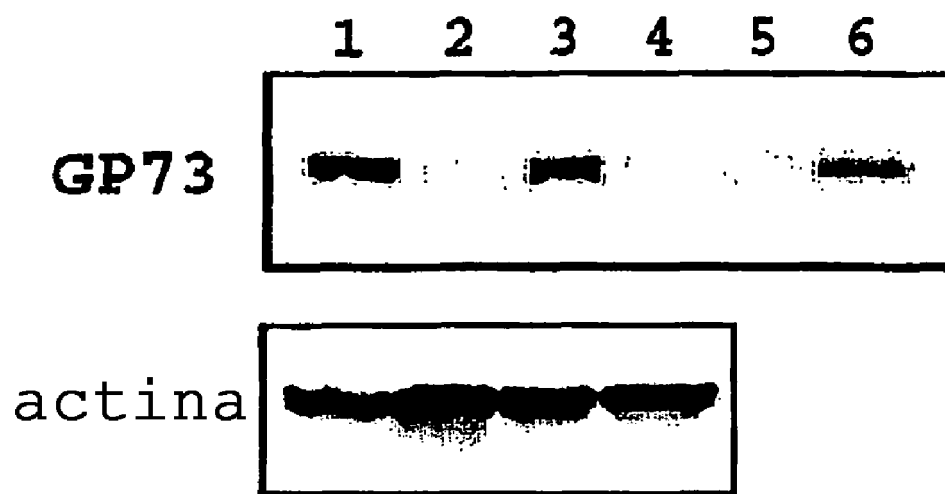


FIG. 1

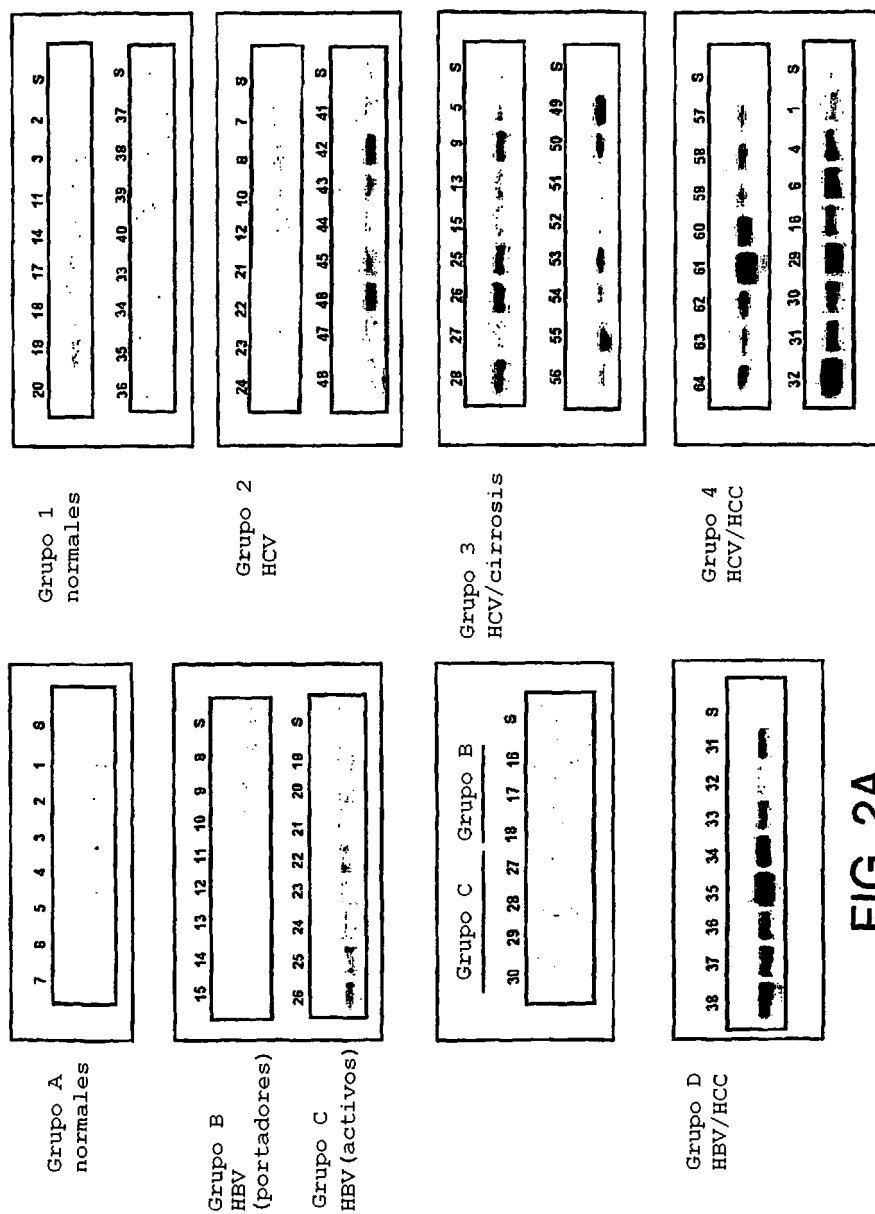


FIG. 2A

FIG. 2B

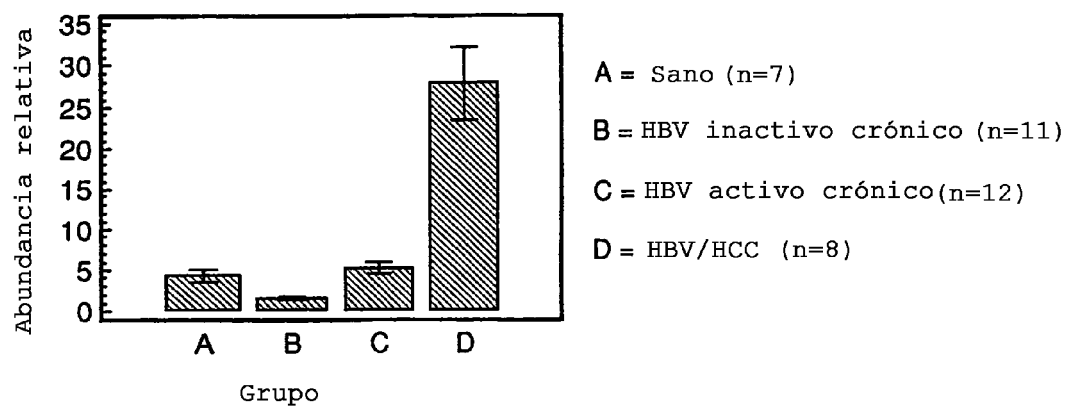


FIG. 3A

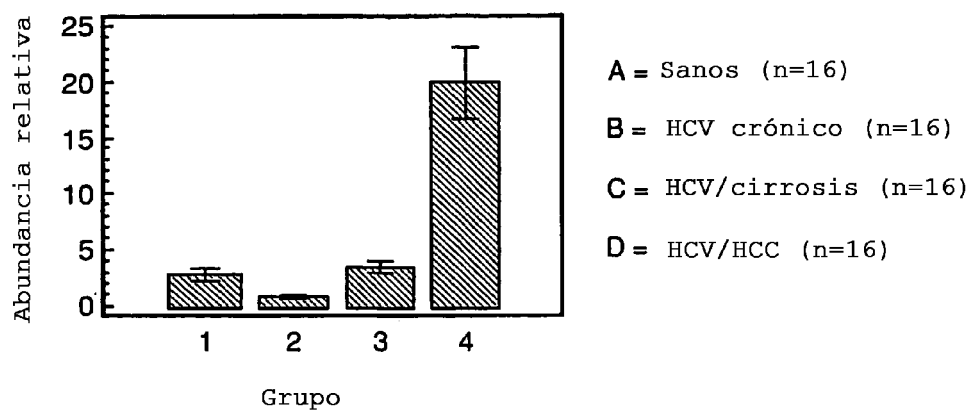
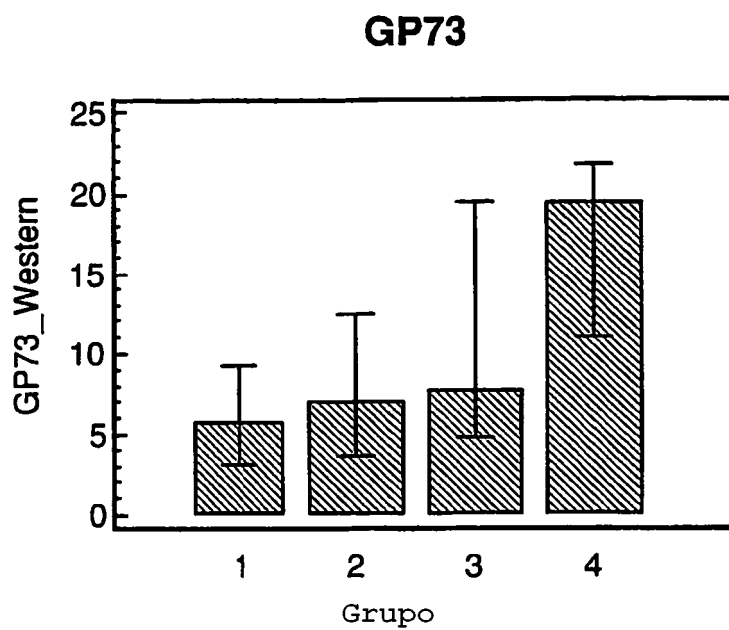
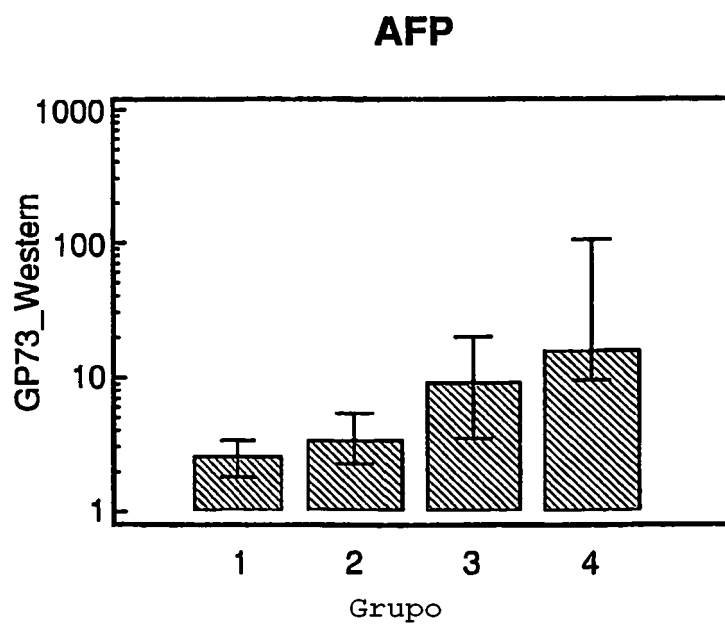


FIG. 3B



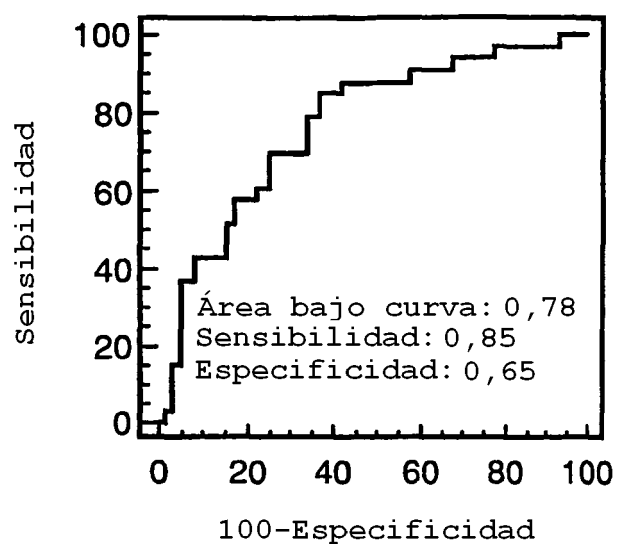
**FIG. 4A**



**FIG. 4B**

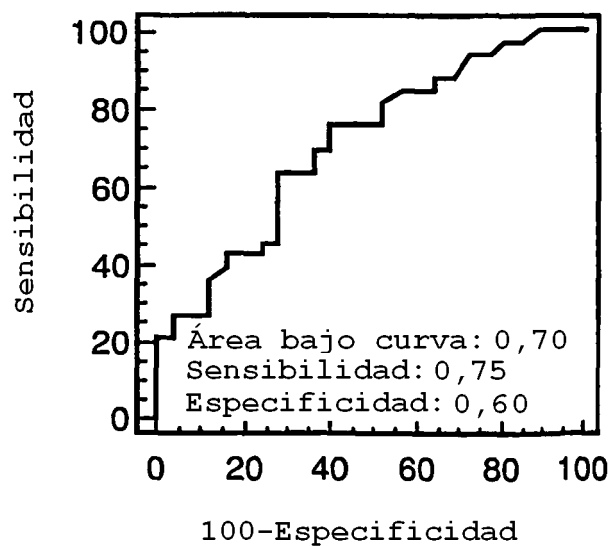


**GP73**



**FIG. 5A**

**AFP**



**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 Claus J. Fimmel					
10	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> <i>Homo sapiens</i>					
<400>	1					
35	cggaggcgct	gggcgcacgg	cgcggagccg	gccggagctc	gaggccggcg	gccccggggag 60
	agcgaccccg	gcggcctcgt	agcggggccc	cggatccccg	agtggcggcc	ggagcctcga 120
	aaagagattc	tcagcgctga	ttttgagatg	atgggcttgg	gaaacggggc	tcgcagcatg 180
	aagtgcggcg	ccctcgctgt	ggccgcctcg	gtggcctgca	tcacgtcttt	gggcttcaac 240
	tactggattg	cgagctcccc	gagcgtggac	ctccagacac	ggatcatgga	gctggaaggc 300
	agggctccga	gggcggctgc	agagagaggc	gccgtggagc	tgaagaagaa	cgagttccag 360
40	ggagagctgg	agaagcagcg	ggagcagctt	gacaaaatcc	agtccagcca	caacttccag 420
	ctggagagcg	tcaacaagct	gtaccaggac	gaaaaaggcg	ttttggtgaa	taacatcacc 480
	acaggtgaga	ggctcatccg	agtgtgcaa	gaccagttaa	agaccctgca	gaggaattac 540
	ggcaggctgc	agcaggatgt	cttccagttt	cagaagaacc	agaccaacct	ggagagggaag 600
	ttctctacg	acctgagcca	gtgcatcaat	cagatgaagg	aggtgaagga	acagtgtgag 660
	gagcgaatag	aaagaggtcac	caaaaagggg	aatgaagctg	tagcttccag	agacctgagt 720
45	gaaaacaacg	accagagaca	gcagctccaa	gccctcagtg	agcctcagcc	caggctgcag 780
	gcagcaggcc	tgccacacac	agaggtgcca	caagggaagg	gaaacgtgct	tggttaacagc 840
	aagtcccaga	caccagcccc	cagttccgaa	gtggttttgg	attcaaagag	acaagttgag 900
	aaagaggaaa	ccaatgagat	ccaggtggtg	aatgaggagc	ctcagaggga	caggctgccc 960
	caggagccag	gccgggagca	ggtggtggaa	gacagacctg	taggtggaag	aggcttcggg 1020
	ggagccggag	aactggggcca	gaccccacag	gtgcaggctg	ccctgtcagt	gagccaggga 1080
50	aatccagaga	tggaggggccc	tgagcgagac	cagcttgcca	tccccgacgg	acaggaggag 1140
	gagcaggaag	ctgccggggg	agggagaaac	cagcagaaac	tgagaggaga	agatgactac 1200
	aacatggatg	aaaatgaagc	agaatctgag	acagacaagc	aagcagccct	ggcagggaat 1260
	gacagaaaca	tagatgtttt	taatgttgaa	gatcagaaaa	gagacaccat	aaattttactt 1320
	gatcagcggtg	aaaagcggaa	tcatacactc	tgaattgaac	tggaaacaca	tatttcacaa 1380
	cagggccgaa	gagatgacta	taaaatgttc	atgagggaact	gaatactgaa	aactgtgaaa 1440
55	tgtactaaat	aaaatgtaca	tctgaagatg	attattgtga	aatttttagta	tgcactttgt 1500
	gtaggaaaaa	atggaatggt	cttttaaaaca	gcttttgggg	gggtactttg	gaagtgtcta 1560
	ataaggtgtc	acaatttttg	gtagtaggta	tttcgtgaga	agttcaacac	caaaactgga 1620
	acatagttct	cttcaagtg	ttggcgacag	cggggcttcc	tgattctgga	atataacttt 1680
	gtgtaaatga	acagccacct	atagaagagt	ccatctgctg	tgaaggagag	acagagaact 1740
	ctgggttccg	tcgtcctgtc	cacgtgctgt	accaagtgtc	ggtgccagcc	tgttacctgt 1800
60	tctcactgaa	aagtctggct	aatgtctctg	tgtagtctac	tctgattctg	acaatcaatc 1860
	aatcaatggc	ctagagcact	gactgttaac	acaaacgtca	ctagcaaaag	agcaacagct 1920
	ttaagtctaa	atacaaagct	gttctgtgtg	agaatttttt	aaaaggctac	ttgtataata 1980
	acccttgtca	tttttaaatg	acaaaacgct	attaagtggc	ttagaatttg	aacattttgtg 2040
	gtctttatgt	actttgtctc	gtgtgtgggc	aaagcaacat	cttccctaaa	tatatattac 2100
	caagaaaagc	agaagcaga	ttaggttttt	gacaaaacaa	acaggccaaa	agggggctga 2160
65	cctggagcag	agcatggtga	gaggcaaggc	atgagagggc	aagtttggtg	tggacagatc 2220
	tgtgcctact	ttattactgg	agtaaaagaa	aacaaagttc	attgatgtcg	aaggatatat 2280

# ES 2 337 791 T3

```

acagtgttag aaattaggac tgttttagaaa aacaggaata caatggttgt ttttatcata 2340
gtgtacacat ttagcttggt gtaaatgact cacaaaactg atttttaaat caagttaatg 2400
tgaattttga aaattactac ttaatcctaa ttcacaataa caatggcatt aaggtttgac 2460
ttgagttggg tcttagtatt atttatggta aataggctct taccacttgc aaataactgg 2520
ccacatcatt aatgactgac ttcccagtaa ggctctctaa ggggtaagta ggaggatcca 2580
caggatttga gatgctaagg ccccagagat cgtttgatcc aaccctctta ttttcagagg 2640
ggaaaatggg gcctagaagt tacagagcat ctagctgggt cgctggcacc cctggcctca 2700
cacagactcc cgagtagctg ggactacagg cacacagtca ctgaagcagg ccctgtttgc 2760
aattcacgtt gccacctcca acttaaacat tcttcatatg tgatgtcctt agtcactaag 2820
gttaaacttt cccacccaga aaaggcaact tagataaaat cttagagtac tttcatactc 2880
ttctaagtc tcttcagcc tcactttgag tcctccttgg gggtgatagg aattttctct 2940
tgctttctca ataaagtctc tattcatctc atgtttaatt tgtacgcata gaattgctga 3000
gaaataaaat gttctgttca acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3042

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Gly Leu Gly Asn Gly Arg Arg Ser Met Lys Ser Pro Pro Leu Val
1      5      10      15
Leu Ala Ala Leu Val Ala Cys Ile Ile Val Leu Gly Phe Asn Tyr Trp
20      25      30      35
Ile Ala Ser Ser Arg Ser Val Asp Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu Leu
35      40      45      50
Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala Glu Arg Gly Ala Val Glu Leu
55      60      65      70
Lys Lys Asn Glu Phe Gln Gly Glu Leu Glu Lys Gln Arg Glu Gln Leu
75      80      85      90
Asp Lys Ile Gln Ser Ser His Asn Phe Gln Leu Glu Ser Val Asn Lys
95      100      105      110
Leu Tyr Gln Asp Glu Lys Ala Val Leu Val Asn Asn Ile Thr Thr Gly
115      120      125      130
Glu Arg Leu Ile Arg Val Leu Gln Asp Gln Leu Lys Thr Leu Gln Arg
135      140      145      150
Asn Tyr Gly Arg Leu Gln Gln Asp Val Leu Gln Phe Gln Lys Asn Gln
155      160      165      170
Thr Asn Leu Glu Arg Lys Phe Ser Tyr Asp Leu Ser Gln Cys Ile Asn
175      180      185      190
Gln Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu Arg Ile Glu Glu Val
195      200      205      210
Thr Lys Lys Gly Asn Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser Glu Asn
215      220      225      230
Asn Asp Gln Arg Gln Gln Leu Gln Ala Leu Ser Glu Pro Gln Pro Arg
235      240      245      250
Leu Gln Ala Ala Gly Leu Pro His Thr Glu Val Pro Gln Gly Lys Gly
255      260      265      270
Asn Val Leu Gly Asn Ser Lys Ser Gln Thr Pro Ala Pro Ser Ser Glu
275      280      285      290
Val Val Leu Asp Ser Lys Arg Gln Val Glu Lys Glu Glu Thr Asn Glu
295      300      305      310
Ile Gln Val Val Asn Glu Glu Pro Gln Arg Asp Arg Leu Pro Gln Glu
315      320      325      330
Pro Gly Arg Glu Gln Val Val Glu Asp Arg Pro Val Gly Gly Arg Gly
335      340      345      350
Phe Gly Gly Ala Gly Glu Leu Gly Gln Thr Pro Gln Val Gln Ala Ala
355      360      365      370
Leu Ser Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Met Glu Gly Pro Glu Arg Asp
375      380      385      390
Gln Leu Val Ile Pro Asp Gly Gln Glu Glu Gln Glu Ala Ala Gly
395      400
Glu Gly Arg Asn Gln Gln Lys Leu Arg Gly Glu Asp Asp Tyr Asn Met
405      410      415      420
Asp Glu Asn Glu Ala Glu Ser Glu Thr Asp Lys Gln Ala Ala Leu Ala
425      430      435      440
Gly Asn Asp Arg Asn Ile Asp Val Phe Asn Val Glu Asp Gln Lys Arg
445      450      455      460
Asp Thr Ile Asn Leu Leu Asp Gln Arg Glu Lys Arg Asn His Thr Leu
465      470      475      480
385      390      395      400

```