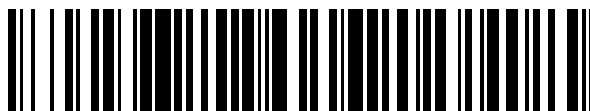


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 312**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08827455 .0**

96 Fecha de presentación: **07.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2187216**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Nuevo marcador del cáncer de hígado**

30 Prioridad:

10.08.2007 JP 2007209544

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

HYOGO COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)

1-1 MUKOGAWA-CHO NISHINOMIYA-SHI

HYOGO 663-8501, JP y

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

NAKAMURA, HIDEJI;

YABUCHI, YOUICHI;

OHMOTO, YASUKAZU;

MORI, TOYOKI;

MURAGUCHI, MASAHIRO;

OGA, KEIKO;

IWATA, FUSAKO y

MURATA, KAORI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 392 312 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo marcador del cáncer de hígado.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de análisis o diagnóstico del cáncer de hígado.

Técnica anterior

10 El factor de crecimiento derivado de hepatoma, HDGF, es un factor de crecimiento aislado de un sobrenadante de cultivo de la línea celular HuH-7 de hepatoma. La clonación del factor de crecimiento se ha completado, y su secuencia de ADN se ha determinado (documento 1 no de patente). Además, es conocido que el factor de crecimiento está localizado en la fracción nuclear, y que estimula la proliferación de células de hepatoma, de células de músculo liso, de células de fibroblastos y células endoteliales vasculares (documentos 2 a 4 no de patente).
15 Además, el HDGF también está localizado en la fracción nuclear de las neuronas. Es conocido que el HDGF se expresa de manera diferenciada en las estirpes celulares de hepatoma y en muestras de tejido de hepatoma (documento 5 no de patente, documento 1 de patente). Contrariamente a su nombre, el "HDGF" está muy distribuido *in vivo*. Además, debido a su acción de tipo factor nutritivo, se ha considerado la posibilidad de utilizar el HDGF para el tratamiento y diagnóstico en pacientes con enfermedades nerviosas.

[Documento no de patente 1] Nakamura H. *et al.*, *JBC* 269:25143-25149 (1994)

[Documento no de patente 2] Nakamura H. *et al.*, *Clin. Chim. Acta.* 183:273-284 (1989)

[Documento no de patente 3] Everett A. D. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 105:567-575 (2000)

25 [Documento no de patente 4] Oliver J. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 102: 1208-1210(1998)

[Documento no de patente 5] Hu T. H. *et al.*, *Cancer* 98: 1444-1456 (2003)

[Documento de patente 1] Documento WO 2004/108964 A1

Exposición de la invención**30 Objetivo que debe conseguir la invención**

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento sencillo de análisis o de diagnóstico de cáncer de hígado.

35 Medios para conseguir el objetivo

Se produjo un anticuerpo contra HDGF y se desarrolló un procedimiento de medición de HDGF basado en el anticuerpo. Además, se determinó, por el procedimiento de medición mencionado anteriormente, que el HDGF existe en la sangre y descubrieron que la cantidad de HDGF era significativamente alta, especialmente en pacientes con cáncer de hígado con hepatopatía crónica.

La presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de pacientes con cáncer de hígado.

45 Punto 1. Procedimiento *in vitro* para analizar si un paciente tiene cáncer de hígado, que comprende detectar un marcador de cáncer de hígado en una muestra de sangre que se ha obtenido del paciente, siendo el marcador un polipéptido derivado del HDGF humano que se une con el anticuerpo que reconoce el HDGF humano, en el que el HDGF humano es la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 1.

50 Punto 2. Procedimiento de análisis tal como se define en el punto 1, en el que la detección se realiza por inmunoanálisis.

Punto 3. Procedimiento de análisis tal como se define en el punto 2, en el que el inmunoanálisis es un ELISA.

55 Punto 4. Procedimiento de análisis tal como se define en el punto 2, en el que el sujeto es un paciente con hepatopatía crónica.

Efectos de la invención

60 La presente invención permite un diagnóstico de cáncer de hígado midiendo el HDGF en la sangre de pacientes con hepatopatía crónica.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 muestra un procedimiento para la cuantificación por ELISA del HDGF.
La figura 2 muestra una curva patrón de HDGF. El intervalo de detección es de 0,31 a 20 ng/ml.

La figura 3 muestra la cantidad de HDGF en la sangre (HDGF en el plasma) de cada paciente con hepatopatía.

Debe apreciarse que HCC indica un paciente con carcinoma hepatocelular, CHC indica un paciente con hepatitis C, CHB indica a un paciente con hepatitis B y LC indica un paciente con cirrosis hepática.

5

Mejor modo de poner en práctica la invención

Las hepatopatías incluyen el cáncer de hígado, la hepatitis vírica tipo B, hepatitis vírica tipo C, cirrosis y otras varias enfermedades. El daño es infligido a las propias células hepáticas. Por lo tanto, puede determinarse la posibilidad de hepatopatía midiendo el contenido de células hepáticas en la sangre. Por ejemplo, tanto GOT como GPT son enzimas que son activas en las células hepáticas. Cuando las células hepáticas se destruyen debido a la hepatitis y similares, GOT y GPT pasan a la sangre. Por lo tanto, las concentraciones de GOT y GPT en la sangre se utilizan como índices indicadores del grado del daño hepático. Las GOT y GPT son índices valiosos de enfermedades tales como la hepatitis aguda, la hepatitis crónica, etc. en las que se destruyen las células hepáticas; sin embargo, no son apropiados como índices de cáncer de hígado, en el que la destrucción de las células de hepáticas no es significativa.

10

15

El HDGF está presente en la fracción nuclear. Porque se suponía que HDGF pasa a la sangre sólo tras la destrucción de las células, era de esperar que HDGF fuera un marcador similar a GOT y GPT; sin embargo, se descubrió en el contexto de la presente invención, contra todas las expectativas, que HDGF, a diferencia de GOT y GPT, es un marcador específico de cáncer de hígado.

20

Marcador de cáncer de hígado

La expresión "HDGF humano" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un factor de crecimiento que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 1.

25

La expresión "anticuerpo que reconoce HDGF humano" incluye anticuerpos que reconocen un péptido parcial producido por descomposición de la HDGF en la medida en que esos anticuerpos reconocen HDGF humano. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos también pueden ser fragmentos de anticuerpo en la medida en que se pueden unir al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen scFv, Fab, F(ab)₂, Fv, etc.

30

El término "polipéptido derivado de HDGF humano" como es utilizado en la presente memoria incluye no sólo polipéptidos que incluyen al propio HDGF humano, sino también una amplia gama de polipéptidos (incluyendo epítopos) que pueden ser reconocidos por el anticuerpo HDGF antihumano, tales como los polipéptidos que incluyen HDGF humano modificado por metilación, amidación, acetilación, etc. *in vivo* y polipéptidos que se acortan por descomposición enzimática o química (específicamente por hidrólisis) del HDGF humano.

35

El marcador de cáncer de hígado de la presente invención incluye un polipéptido derivado del HDGF humano. Los pacientes de cáncer de hígado muestran una cantidad mayor de polipéptido humano derivado del HDGF en la sangre. Las muestras utilizadas para la medición de un marcador de cáncer de hígado incluyen sangre, plasma y suero.

40

Es de esperar que el marcador de cáncer de hígado, de la presente invención sea utilizable como marcador de cáncer de mayor precisión al combinar el marcador de cáncer de hígado de la presente invención con otros marcadores de cáncer de hígado convencionalmente conocidos tales como, por ejemplo, AFP (α -fetoproteína), que es una proteína producida en el hígado y el saco vitelino durante la vida fetal y cuyo aumento se observa en aproximadamente 80% de los pacientes con carcinoma hepatocelular.

45

50

Procedimiento de análisis

A continuación se describe con detalle el procedimiento de análisis del cáncer de hígado de la presente invención.

El presente procedimiento de análisis comprende la etapa de detección de un marcador de cáncer de hígado. La muestra que debe evaluarse es de sangre. La muestra puede ser de suero o plasma.

55

No existen limitaciones particulares en el procedimiento de detección o medición de un marcador de cáncer de hígado en la medida en que el polipéptido derivado del HDGF en la sangre pueda medirse por el procedimiento. Los ejemplos preferidos de dichos procedimientos incluyen procedimientos bioquímicos utilizados comúnmente, particularmente los procedimientos basados en principios inmunológicos. Los ejemplos preferidos incluyen procedimientos tales como ELISA, inmunotransferencia Western y radioinmunoanálisis (RIA), que utilizan un anticuerpo contra una sustancia objetivo que debe medirse. Además, cuando se utiliza un anticuerpo, el anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Alternativamente, se puede utilizar una molécula tal como un aptámero, que deriva de un ácido nucleico y tiene afinidad por una sustancia diana que debe medirse. Además, cuando los contaminantes están presentes en la muestra, la molécula diana en primer lugar se purifica, o la pureza de la

60

65

muestra se incrementa hasta un punto en el que los contaminantes no tienen efecto antes de utilizar la muestra para la medición. Los métodos de purificación incluyen filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, cromatografía de fase normal, diversas técnicas de electroforesis, precipitación en sulfato amónico, precipitación en un disolvente orgánico, precipitación isoelectrónica, etc. Estos procedimientos pueden utilizarse según la situación. Debe apreciarse que son proporcionados únicamente a título de ejemplo y que el procedimiento de purificación no se limita a estos procedimientos mencionados anteriormente.

El ELISA puede ser un método directo o un método sándwich al producir un kit de ELISA para cuantificar el HDGF. La cuantificación puede realizarse según los procedimientos convencionales. Además, en este caso, pueden utilizarse un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Por ejemplo, en el caso de un método de sándwich, un anticuerpo primario (anticuerpo anti-HDGF) se inmoviliza generalmente en una placa de 96 pocillos. Una muestra procedente de un cuerpo vivo (sangre, suero o plasma), que puede diluirse, según sea necesario, con una solución tampón adecuada, se agrega a la placa para permitir el contacto con el anticuerpo durante un determinado período de tiempo, con lo que la muestra se une al anticuerpo. Después de lavar la placa con una solución tampón apropiada, se agrega un anticuerpo secundario marcado (anticuerpo anti-HDGF marcado) para la reacción. Por ejemplo, cuando la sustancia marcadora es biotina, se agrega peroxidasa marcada con avidina (o estreptavidina) para reacción y se agrega un sustrato reactivo adecuado (por ejemplo, TBM) para desarrollo del color. Tras un determinado período de tiempo, la medida se realiza en una longitud de onda específica (450 nm en este caso), con lo que la determinación colorimétrica se lleva a cabo. El marcaje de peroxidasa (HRP), el marcaje de fosfatasa alcalina, el marcaje de fosfatasa ácida, el marcaje de glucosa oxidasa, el marcaje de tirosinasa y similares pueden utilizarse como anticuerpos marcados con avidina. No existen limitaciones particulares sobre el sustrato, dado que el sustrato está comercializado y se utiliza comúnmente.

Además, puede utilizarse también un método de inmunotransferencia Western como un método de medición inmunológica. En el método de la presente invención, la electroforesis se realiza en la muestra (los ejemplos representativos de electroforesis incluyen la electroforesis en papel y la electroforesis isoelectrónica tal como SDS-PAGE, PAGE, etc.); la muestra se transfiere a una membrana de transferencia como una membrana de nitrocelulosa, una membrana PVDF, etc.; se agrega a la muestra un anticuerpo primario contra una molécula diana que debe cuantificarse; y se agrega a la muestra un anticuerpo secundario unido a un anticuerpo marcado tal como una partícula de pigmento, o, cuando se utiliza una enzima marcada, se añade un sustrato para la enzima a la muestra después del tratamiento, con lo que se permite observar la molécula diana. Se utiliza anticuerpo marcado con biotina como anticuerpo marcado, al que se une avidina o estreptavidina. O un anticuerpo marcado con peroxidasa (HRP), un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina, un anticuerpo marcado con fosfatasa ácida, un anticuerpo marcado con glucosa oxidasa, un anticuerpo marcado con tirosinasa o similar se utiliza como anticuerpo secundario. No existen limitaciones particulares sobre el sustrato, en la medida en que el sustrato está comercializado y se utiliza comúnmente.

Además, el anticuerpo utilizado para la medición puede obtenerse según procedimientos convencionales. Por ejemplo, en el caso de la producción de un anticuerpo policlonal, animales de sangre caliente, como conejos, ovejas, cobayas y pollos se inmunizan varias veces con una sustancia emulsionada que generalmente que suele prepararse mezclando el antígeno diana mencionado anteriormente (HDGF humano, o su péptido parcial o polipéptido parcial) con adyuvante completo de Freund. Un antisero resultante puede obtenerse según procedimientos convencionales. Además, en el caso de los pollos, éstos se inmunizan varias veces con el antígeno inmunizante mencionado anteriormente, la IgY se produce en los huevos puestos por las gallinas, y la IgY puede obtenerse de la yema de los huevos según los procedimientos convencionales.

Además, el anticuerpo puede obtenerse como un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal puede obtenerse, por ejemplo, inmunizando ratones varias veces con el antígeno inmunizante mencionado anteriormente junto con adyuvante completo de Freund para producir un anticuerpo, aislando las células productoras de anticuerpos resultantes según procedimientos convencionales tales como un procedimiento de fusión celular y cultivando las células. El anticuerpo así obtenido puede purificarse más, según sea necesario, según los procedimientos convencionales tales como precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.

Enfermedad y paciente que va a diagnosticarse

La presente invención puede utilizarse para el diagnóstico de pacientes con hepatopatía crónica, especialmente para determinar si su hepatopatía crónica ha evolucionado a cáncer de hígado. En el caso de pacientes con hepatitis vírica o cirrosis, el cáncer puede definirse como la última etapa de la evolución de estas enfermedades. Para la evaluación del estado mental de los pacientes o de la motivación para el tratamiento, es importante para los pacientes con hepatopatía crónica saber en qué fase patológica están.

Procedimiento de diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de hígado en pacientes con hepatopatía crónica según la presente invención se hace

cuantificando la cantidad de HDGF en la sangre. Específicamente, el presente procedimiento puede realizarse en un kit ELISA y en una composición del kit que incluye varios reactivos para inmunotransferencia Western. En particular, el kit incluye un anticuerpo contra HDGF. Además del anticuerpo, el kit incluye albúmina como ABS, anticuerpos secundarios, sustratos enzimáticos (cuando se utiliza una enzima como marcador) y similares. Por ejemplo, cuando el anticuerpo de reconocimiento es un anticuerpo marcado con biotina, el kit de cuantificación puede incluir una avidina marcada con peroxidasa como anticuerpo secundario. Además, el kit para diagnóstico de cáncer de hígado puede incluir un sustrato para la peroxidasa y similares.

Ejemplo

Se describe a continuación con mayor detalle la presente invención haciendo referencia a un ejemplo. Sin embargo, los detalles de la presente invención no se limitan al siguiente ejemplo.

Ejemplo 1

Construcción del sistema de cuantificación de ELISA para la producción de HDGF para antígeno-anticuerpo monoclonal y un preparado normal

En primer lugar, el gen HDGF humano resulta conocido, y el gen está representado por la SEC. ID. nº 2. La clonación se realiza según los métodos convencionales. Específicamente, la zona entre el codón de iniciación y el codón de terminación del gen HDGF se amplió por el método RCP utilizando un banco de ADNc de riñón humano. Se agregó una secuencia Ndel al extremo 5' del cebador directo y se agregó una secuencia XhoI al extremo 3' del cebador inverso. Se obtuvo ADNc del HDGF clonando un producto de la RCP en vector pCR truncado y confirmando la secuencia de ADN.

A continuación, el ADNc del HDGF de la presente invención y un enlazador con etiqueta His se insertaron en el vector pSecTag2, y de este modo se construyó un vector de expresión (pSecTag2-HDGF). Además, el vector de expresión obtenido (pSecTag2-HDGF) se introdujo en células CHO-K1, las células se cultivaron en el medio que contenía zeocina en condiciones de dilución restringidas y de este modo se construyeron clones resistentes. Además, se confirmó la presencia de HDGF en el sobrenadante del cultivo.

A continuación, se cultivaron en masa clones de HDGF de alta producción (clon 4 CHO/HDGF), se recogieron los sobrenadantes del cultivo y se purificó el antígeno HDGF.

Específicamente, el antígeno HDGF se purificó por cromatografía en columna de resina Ni, cromatografía en columna de heparina-Sepharose y HPLC en columna resource Q para obtener inmunógeno y un preparado normal.

Producción de anticuerpo monoclonal de ratón

Se inmunizaron ratones según procedimientos convencionales y se seleccionó un hibridoma que produce un anticuerpo deseado. Específicamente, se inmunizaron ratones con una emulsión que se prepara mezclando solución de antígeno con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La inmunización se realizó cada dos semanas, para un total de 5 inmunizaciones.

A continuación, se prepararon esplenocitos de ratones inmunizados y se mezclaron con células de mieloma (P3U1) preparadas con antelación de modo que la proporción de esplenocitos a P3U1 fue de 5:1 ó 2:1. Después de la separación centrífuga, se añadió solución de PEG, al sedimento celular, agitándose bien. Una vez la mezcla se uniformizó, se mantuvo todavía. Se eliminó el sobrenadante después de centrifugación y el sedimento se puso en suspensión en un FCS/RPMI 1640 al 10% enriquecido con 100 ml de HAT. Las células se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos (Coaster) a razón de 1 ml/pocillo y se cultivaron a 37°C CO₂ al 5% para permitir la fusión celular.

Se clonaron hibridomas positivos de la siguiente manera.

Un sobrenadante de cultivo se retiró de cada pocillo una semana a 10 días después de la fusión celular y se realizó la detección de anticuerpos. El sobrenadante del cultivo se hizo reaccionar en una placa de 96 pocillos (NUNC) a la que se inmovilizó el antígeno HDGF para comprobar la presencia de anticuerpos por ELISA.

Para la producción de ascitis, se inyectó pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) a ratones por vía intraperitoneal a 0,5 ml/cuerpo por lo menos 3 días antes de la inyección de células. Las células de hibridoma se pusieron en suspensión en 1,5 ml de PBS, y se inyectaron por vía intraperitoneal 0,5 ml de células de hibridoma a cada uno de 3 ratones. Se recogió la ascitis de los ratones cuando el abdomen de los ratones inyectados con las células eran mayores.

Se purificó el anticuerpo monoclonal de ascitis aplicando la ascitis a la columna de proteína A y se verificó su concentración comprobando de la pureza por SDS-PAGE.

Producción de anticuerpo policlonal de conejo

5 Se mezcló solución de antígeno HDGF con adyuvante completo de Freund para preparar una emulsión y se inmunizaron conejos por vía intradérmica en el lomo en varios puntos (1 ml/punto).

10 La inmunización se realizó cada dos semanas. Se extrajo sangre parcialmente del lóbulo de la oreja una semana después de tres inmunizaciones. Se comprobó por ELISA el título de anticuerpos del suero y se repitieron cuatro inmunizaciones más. Toda la sangre se extrajo de la arteria carótida una semana después de la inmunización final (extracción de sangre con heparina). La sangre se sometió a la separación centrífuga para obtener plasma.

15 Debe apreciarse que para la producción de un anticuerpo policlonal que utiliza un péptido con terminal C como antígeno, un péptido que tiene una Cys en el terminal N del péptido con terminal C (aminoácidos en posiciones 231 al 240 del terminal N) se sintetizó, purificó y acopló a KLH como antígeno (KLH-C-APGIRDHESL).

Creación de ELISA

20 Para un ELISA para el HDGF, el anticuerpo monoclonal OPM-11617 se diluyó hasta 5 µg/ml en Na₂CO₃ 0,1 M, inmovilizado en cada pocillo, y se bloqueó con ABS al 0,1%/PBS. Se utilizó ABS al 0,1%/PBS/Tween-20 al 0,05% como primer tampón, que se colocó en una placa de 96 pocillos con antelación. El HDGF patrón se diluyó utilizando 20 ng/ml de ABS/PBS. Se prepararon 7 diluciones en serie al doble a partir de 20 ng/ml de preparado patrón que tienen diferentes concentraciones, y se utilizó un blanco para determinar la curva de calibración. Un volumen de 50 µl de preparado patrón y la muestra se añadió al pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de lavar el pocillo, el anticuerpo con terminal C (100 µl) diluido 40000 veces por ABS al 0,1%/PBS/Tween-20/al 0,05% se añadió al pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Además, la placa fue lavada, y se añadió a cada pocillo avidina marcada con HRP diluida 10.000 veces y se permitió su reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa, se añadió solución TMB a la placa y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se interrumpió con ácido sulfúrico 2N. La absorbancia se fijó a 450 y se midió a la longitud de onda. La figura 1 presenta un procedimiento para la medida.

30 La figura 2 muestra una curva de calibración de HDGF. El intervalo de medición está comprendido entre 0,31 ng/ml y 20 ng/ml. La medición de HDGF en el cultivo celular resultó posible.

Medición de HDGF en el suero de pacientes con hepatopatía crónica

35 Se extrajo sangre de pacientes con cáncer de hígado (61 personas), con hepatitis vírica tipo C (61 personas), con hepatitis vírica tipo B (9 personas), con cirrosis (55 personas) y hepatitis aguda (3 personas) durante el ayuno y el valor de HDGF en el plasma se midió utilizando el sistema ELISA creado descrito anteriormente. Los resultados demuestran que la cantidad de HDGF es significativamente alta en el plasma de pacientes con cáncer de hígado (figura 3, tabla 1).

Tabla 1

	Cáncer de hígado	Hepatitis C	Hepatitis B	Cirrosis hepática	Hepatitis aguda
Negativo	25	54	4	40	1
Positivo	36	7	5	15	2
Total/240	61	61	9	55	3

45 **Listado de secuencias**

<110> HYOGO COLLEGE OF MEDICINE OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Nuevo marcador del cancer de hígado

50 <130> P08-90, 139898

<150> JP2007-209544
<151> 2007-08-10

55 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.4

60 <210> 1
<211> 240
<212> PRT

ES 2 392 312 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Arg Ser Asn Arg Gln Lys Glu Tyr Lys Cys Gly Asp Leu Val
 1 5 10 15
 Phe Ala Lys Met Lys Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Ile Asp Glu
 20 25 30
 Met Pro Glu Ala Ala Val Lys Ser Thr Ala Asn Lys Tyr Gln Val Phe
 35 40 45
 Phe Phe Gly Thr His Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Leu Phe
 50 55 60
 Pro Tyr Glu Glu Ser Lys Glu Lys Phe Gly Lys Pro Asn Lys Arg Lys
 65 70 75 80
 Gly Phe Ser Glu Gly Leu Trp Glu Ile Glu Asn Asn Pro Thr Val Lys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Tyr Gln Ser Ser Gln Lys Lys Ser Cys Val Glu Glu Pro
 100 105 110
 Glu Pro Glu Pro Glu Ala Ala Glu Gly Asp Gly Asp Lys Lys Gly Asn
 115 120 125
 Ala Glu Gly Ser Ser Asp Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Lys Glu Lys Asn Glu Lys Gly Ala Leu Lys Arg Arg Ala Gly Asp
 145 150 155 160
 Leu Leu Glu Asp Ser Pro Lys Arg Pro Lys Glu Ala Glu Asn Pro Glu
 165 170 175
 Gly Glu Glu Lys Glu Ala Ala Thr Leu Glu Val Glu Arg Pro Leu Pro
 180 185 190
 Met Glu Val Glu Lys Asn Ser Thr Pro Ser Glu Pro Gly Ser Gly Arg
 195 200 205
 Gly Pro Pro Gln Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ala
 210 215 220
 Thr Lys Glu Asp Ala Glu Ala Pro Gly Ile Arg Asp His Glu Ser Leu
 225 230 235 240

<210> 2

<211> 2376

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

5

10

ES 2 392 312 T3

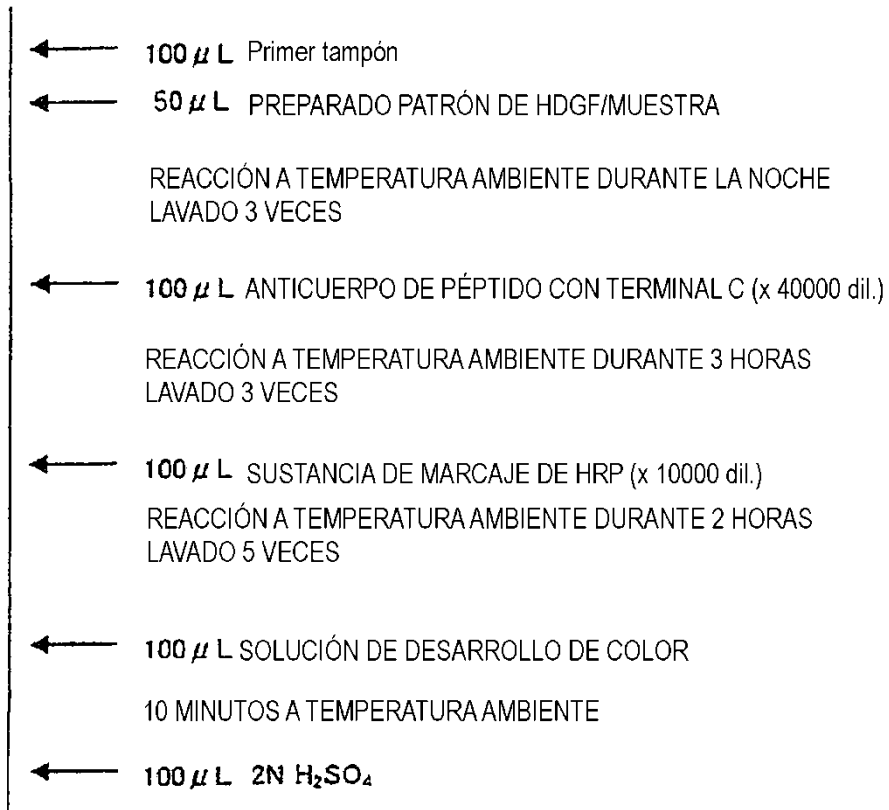
gaggaggagt ggggaccggg cggggggtgg aggaagaggc ctgcgcaga ggaggagca 60
attgaatttc aaacacaaac aactcgacga gcgcgcaccc accgcgccgg agccttgccc 120
cgatccgcgc ccgccccgtc cgtgcggcgc gcgggaggag acgccgtggc cgcgccggag 180
ctcgggccgg gggccacccat cgaggcgggg gccgcgcgag ggccggagcg gagcggcgcc 240
gccaccgccc cacgcgcaaa cttgggctcg cgcttcccgg cccggcgccg agcccggggc 300
gcccggagcc ccgccatgtc gcgatccaac cggcagaagg agtacaatg cggggacctg 360
gtgttcgcca agatgaaggg ctaccacac tggccggccc ggattgacga gatgcctgag 420
gtgcccgtga aatcaacagc caacaatac caagtctttt ttttcgggac ccacgagacg 480
gcattcctgg gccccaaaga cctcttccct tacgaggaat ccaaggagaa gtttggcaag 540
cccaacaaga ggaaagggtt cagcgagggg ctgtgggaga tcgagaaca ccctactgtc 600
aaggcttccg gctatcagtc ctcccagaaa aagagctgtg tggaagagcc tgaaccagag 660
cccgaagctg cagaggggtga cggtgataag aaggggaatg cagagggcag cagcgcagag 720
gaagggagc tggctattga tgagccagcc aaggagaaga acgagaaagg agcgttgaag 780
aggagagcag gggacttgct ggaggactct cctaaacgtc ccaaggaggc agaaaacct 840
gaaggagagg agaaggaggc agccacctg gaggttgaga ggccccttc tatggaggtg 900
gaaaagaata gcacccctc tgagccggc tctggccggg ggcctccca agaggaagaa 960
gaagaggagg atgaagagga agaggctacc aaggaagatg ctgaggcccc aggcacaga 1020
gatcatgaga gcctgtagcc accaatgttt caagaggagc cccacctg ttcctgctgc 1080
tgtctgggtg ctactgggga aactggccat ggcctgcaaa ctgggaaccc cttcccacc 1140
ccaacctgct ctctcttct actcactttt cccactcca gccagccca tggagattga 1200
cctggatggg gcaggccacc tggctctcac ctctaggtcc ccatactcct atgatctgag 1260
tcagagccat gtcttctccc tggaaatgagt tgaggccact gtgttccttc cgcttggagc 1320
tattttccag gcttctgctg gggcctggga caactgctcc cacctcctga cacccttctc 1380
ccactctctt aggcattctg gacctctggg ttgggatcag gggtaggaat ggaaggatgg 1440
agcatcaaca gcagggtggg cttgtggggc ctgggagggg caatcctcaa atgcggggtg 1500
ggggcagcac agggggggc cctccttctg agctcctgtc ccctgctaca cctattatcc 1560
cagctgccta gattcagggg aagtgggaca gcttgtaggg gaggggctcc tttccataaa 1620
tccttgatga ttgacaacac ccatttttcc ttttgccgac cccaagagtt ttgggagttg 1680
tagttaatca tcaagagaat ttggggcttc caagttgttc gggccaagga cctgagacct 1740
gaagggttga ctttaccat ttgggtggga gtgttgagca tctgtcccc tttagatctc 1800
tgaagccaca aataggatgc ttgggaagac tcctagctgt ctttttccct ctccacacag 1860
tgctcaaggc cagcttatag tcatatata caccagaca taaaggaaaa gacacatttt 1920
ttaggaaatg ttttaataa aagaaaatta caaaaaaaaaa ttttaaagac ccctaacct 1980
ttgtgtgctc tccattctgc tccttccca tcgttgcccc catttctgag gtgcaactggg 2040
aggctcccct tctatttggg gcttgatgac tttcttttg tagctggggc tttgatgttc 2100
cttcagtgat catttctcat ccacataccc tgacctggcc cctcagtgat tgcaccaga 2160
tctgatttgt aaccactga gaggacagag agaaataagt gccctctccc accctcttcc 2220
tactggtctc tctatgctc tctacagtct cgtctctttt accctggccc ctctccctg 2280
ggctctgatg aaaaattgct gactgtagct ttggaagttt agctctgaga accgtagatg 2340
atttcagttc taggaaaata aaacccgttg attact 2376

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para analizar si un paciente tiene cáncer de hígado, que comprende detectar un marcador de cáncer de hígado en una muestra de sangre que se ha obtenido del sujeto, siendo el marcador un polipéptido derivado del HDGF humano que se une al anticuerpo que reconoce el HDGF humano, en el que el HDGF humano es la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 1.
2. Procedimiento de análisis según la reivindicación 1, en el que la detección se realiza por inmunoanálisis.
- 10 3. Procedimiento de análisis según la reivindicación 2, en el que el inmunoanálisis es un ELISA.
4. Procedimiento de análisis según la reivindicación 2, en el que el sujeto es un paciente con hepatopatía crónica.

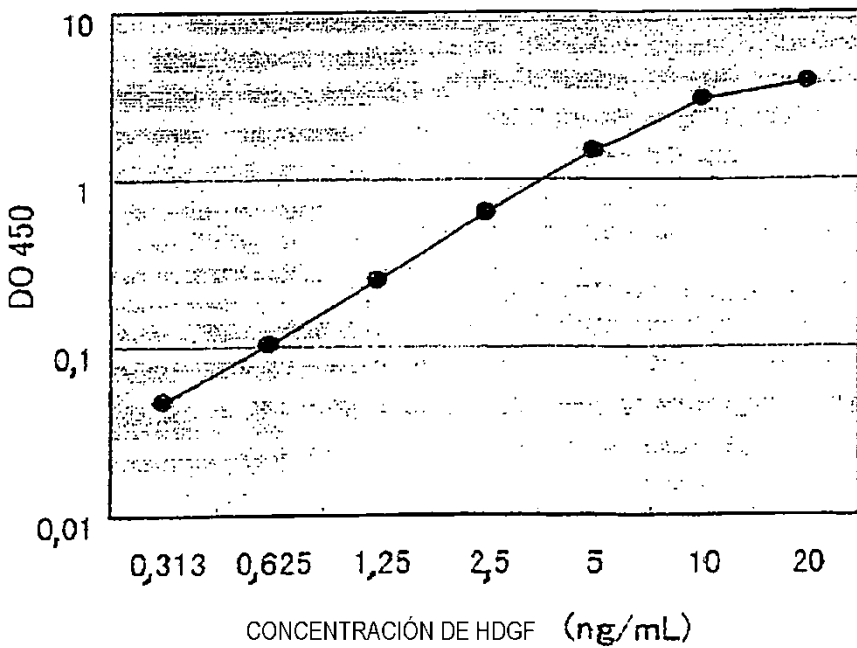
[Fig. 1]

INMOVILIZACIÓN DE OPM-11617 DESHIDRATADA EN LA PLACA



MEDICIÓN DE ABSORBENTE (D.O. 450)

[Fig. 2]



[Fig. 3]

