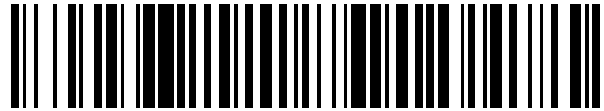


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 101**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2007 E 07701052 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2035577**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

07.11.2006 KR 20060109483

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2013

73 Titular/es:

**CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRIAL
COOPERATION FOUNDATION (50.0%)
664-14, Deokjin-dong 1-ga Deokjin-gu
Jeonju-si, Jeollabuk-do 561-756, KR y
CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, DAE-GHON y
YU, GYUNG-RAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 429 101 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

Procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular midiendo la cistatina B (CSTB, estefina B) presente en el tejido y el fluido corporal de un paciente con carcinoma hepatocelular.

Estado de la técnica

10 Existen varios procedimientos para diagnosticar cánceres usando marcadores tumorales. La mayoría de ellos se realizan por un análisis de sangre usando un anticuerpo, y algunos de ellos se realizaron usando fluido extraído de tejido, orina, heces, o similares. Los marcadores tumorales varían de acuerdo con las regiones, en las que se producen cánceres, pero no existe un marcador tumoral que detecte todos los tipos de cánceres humanos. Además, existen muchos cánceres en los que no se encuentran marcadores tumorales. Por lo tanto, para desarrollar un mejor diagnóstico de cáncer usando marcadores tumorales, se han realizado estudios en el diagnóstico usando un anticuerpo monoclonal, un haz de láser, un radioisótopo, una sonda quimioluminiscente, un analizador automático o similares.

15 Existen marcadores tumorales específicos que sólo se producen por células cancerosas específicas en el cuerpo humano. Por lo tanto, un nivel elevado del marcador tumoral hace posible diagnosticar un cáncer que se produce en un órgano específico, lo que se denomina "alta especificidad de órgano". Ejemplos de los marcadores tumorales que pertenecen a los grupos mencionados anteriormente incluyen un antígeno específico de próstata y de cáncer de próstata (PSA), una gonadotropina coriónica humana (hCG) de célula embrionaria y de placenta, una enolasa específica de neurona (NSE) y de célula neuroendocrina, de glándulas endocrinas y varias hormonas, de neurilemoma y catecolamina (VMA), una alfa fetoproteína (AFP) de célula hepática, de célula embrionaria. Sin embargo, en muchos casos, un marcador tumoral es producido por varios órganos. En consecuencia, incluso si el nivel del marcador específico es elevado, es difícil determinar el órgano en el que se produce el cáncer. Por ejemplo, el marcador tumoral tal como CEA y CA19-9 es producido por células cancerosas en varios órganos que incluyen estómago, colon, páncreas y pulmón. Por tanto, incluso si el marcador tumoral está presente en suero con una gran cantidad, es imposible determinar el órgano en el que se produce el cáncer.

20 No obstante, los marcadores tumorales se emplean útilmente en el diagnóstico de cáncer, y los marcadores tumorales varían ampliamente dependiendo de los tipos de cánceres, ya que el diagnóstico temprano es muy importante, y un paciente en el estadio más temprano de cáncer no tiene conocimiento de ningún síntoma. Además, no existe un marcador tumoral que pueda detectar todos los tipos de cánceres por una prueba en una etapa, y muchos cánceres no producen un marcador tumoral eficaz. En consecuencia, muchos estudios han tratado de buscar un marcador tumoral mejor.

35 El carcinoma hepatocelular es un tumor maligno primario, que se produce en el hígado. Las células de cáncer de otras partes del cuerpo metastatizan en el hígado, para desarrollar carcinoma hepático metastásico. Un 90 % o más del total de cánceres de hígado son carcinoma hepatocelular. Incluso después de un tratamiento curativo de carcinoma hepatocelular, la tasa de recurrencia es de un 40 a un 80 %. En la mayoría de los casos, los tumores vuelven a aparecer en el hígado, pero vuelven a aparecer en el pulmón y ganglio linfático, o la superficie interna de la pared abdominal y mediastino. La proporción de carcinoma hepatocelular en pacientes hombres con respecto a mujeres en número es de 4 a 1, y estos tumores se producen mayormente en pacientes de mediana edad y de edad más avanzada.

40 El carcinoma hepatocelular está provocado por el virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, hepatopatía alcohólica, hepatopatía metabólica y otras toxinas. En particular, se sabe que de un 65 a un 80 % de los pacientes con carcinoma hepatocelular en Corea tienen el transportador del antígeno de Hepatitis B.

45 Un paciente en un estadio temprano de carcinoma hepatocelular no tiene síntomas, y si el paciente experimenta algunos síntomas, ya está en un estadio avanzado. Principalmente, los síntomas son fatiga, dolor abdominal o distensión, y pérdida de apetito. El síntoma específico es solidez abdominal palpable en el área precordial, lo que indica que el cáncer ha avanzado significativamente. Cuando la masa de carcinoma hepatocelular puede irrumpir en la cavidad abdominal, el paciente tiene dolor abdominal brusco y distensión, hipotensión o choque, o similares.

50 Los pacientes con carcinoma hepatocelular pueden morir de progresión tumoral, y pueden morir de cirrosis adjunta. Por lo tanto, se necesita un tratamiento para evitar el desarrollo de carcinoma hepatocelular y cirrosis simultáneos. Cuando el cáncer se diagnostica de forma temprana, y por tanto se lleva a cabo cirugía, se puede curar completamente. Por otra parte, en el caso de pacientes con el cáncer significativamente avanzado, función hepática mala, o cáncer metastásico, en lugar de cirugía se realizan tratamientos tales como inyección de etanol percutánea, quimioembolización transarterial y ablación con radiofrecuencia.

55 Puesto que el pronóstico de carcinoma hepatocelular no es bueno, su prevención y diagnóstico temprano es importante. Para evitar y diagnosticar temprano la enfermedad, se ha de llevar a cabo la inoculación de la vacuna de

hepatitis B. Además, los pacientes con hepatitis o cirrosis crónica tienen que realizar un examen médico una vez cada de tres a seis meses.

5 Recientemente, se encontró un gen supresor tumoral tal como p53, -catenina, y Axin1, o mutación de oncogén en tejido tumoral y existe un informe de que dichos genes pueden estar implicados en la aparición de cáncer de hígado. Sin embargo, la frecuencia de la mutación de los genes es muy baja, por lo que es difícil determinar una correlación entre la mutación de los genes y la progresión del cáncer de hígado. En consecuencia, los estudios en biología molecular sobre la causa y la progresión del cáncer de hígado aún son un reto por resolver.

10 En general, el carcinoma hepatocelular que se produce en Corea se desarrolla con cirrosis producida previamente, y se sabe que el tejido hepático acompañado por cirrosis incluye un estadio intermedio entre el nódulo de regeneración no neoplásico como lesión precursora y el carcinoma hepatocelular maligno. Se dice que la lesión nodular es un nódulo displásico, que se puede clasificar en un nódulo displásico de grado bajo y un nódulo displásico de grado alto de acuerdo con su grado. Los carcinomas hepatocelulares pequeños se encuentran frecuentemente en el nódulo displásico de grado alto. Por lo tanto, el nódulo displásico de alto grado se ha considerado un estadio precanceroso de carcinoma hepatocelular. La lesión precursora para cáncer de hígado se puede clasificar histológicamente en carcinoma hepatocelular temprano, carcinoma *in situ*, o similares de acuerdo con los anatomopatólogos. El estadio precanceroso de cáncer de hígado aún es un tema controvertido, y el mecanismo molecular que subyace al desarrollo de carcinoma hepatocelular desde un estadio precanceroso aún no se ha esclarecido. El carcinoma hepatocelular se clasifica histopatológicamente en cuatro grados de acuerdo con el grado de Edmondson. El grado de diferenciación y tamaño de las células tumorales representa cambios morfológicos, lo que indica que la progresión del cáncer de hígado es por etapas, pero el mecanismo biológico molecular del mismo aún no se ha esclarecido.

15 Recientemente se ha introducido una tecnología de micromatriz de ADN para permitir el análisis comprensivo de la expresión génica, y es una tecnología genómica nueva empleada en estudios oncológicos. Algunos investigadores han intentado demostrar el desarrollo del cáncer de hígado usando perfiles de expresión molecular, pero la gran familia génica en cada estadio de acuerdo con la progresión de carcinoma hepatocelular en el estadio temprano y tardío aún no ha sido examinada, y el examen proporcionará una información importante para entender el desarrollo del carcinoma hepatocelular en un estadio temprano y la invasividad y metástasis del carcinoma hepatocelular en un estadio tardío.

20 Un marcador molecular representativo para el carcinoma hepatocelular, AFP, es una glucoproteína que se produce de forma anormal cuando las células hepáticas se transforman para desdiferenciarse en células cancerosas, y se usan para el descubrimiento y la observación en el tratamiento de cáncer hepático primario, hepatitis, cirrosis, y tumor de saco vitelino. La AFP se produce en el hígado fetal o el saco vitelino. Su concentración alcanza un máximo en la semana 13, y a continuación desciende bruscamente. Su concentración es muy baja en un adulto normal (de 7 a 10 ng/ml o menor), pero el incremento en el nivel de AFP significa un incremento grave de células cancerosas, en particular, en un paciente con cáncer asociado a células hepáticas, se observa de un 50 a un 70 % o más del incremento en el nivel de AFP. Si el nivel de AFP es de 7 a 15 ng o menor por 1 ml de sangre, se considera como negativo.

25 En el caso de cáncer de hígado, hepatitis, y cirrosis, que se producen simultáneamente con el cáncer de hígado, se puede producir el marcador tumoral, AFP, y se sabe que su cantidad se incrementa alrededor de 500 ng/ml. Además, en obstetricia y ginecología, el incremento de AFP en sangre o líquido amniótico de la embarazada puede ser un índice para detectar defectos congénitos tales como anencefalía, espina bífida, e hidrocefalia. La AFP muestra menor sensibilidad y especificidad en el cáncer de hígado en un estadio temprano, y promueve un empeoramiento en la cirrosis y hepatitis crónica. En consecuencia, actualmente se investigan algunos marcadores novedosos tales como DCP (Des-gamma carboxiprotrombina), PIVKA-II (protrombina inducida por ausencia de vitamina K II), AFP-L3 (aglutinina de lens culinaris reactiva), y GPC3 (glicano-3) para determinar si se pueden usar como un marcador de diagnóstico para el cáncer de hígado en un estadio temprano. Además, aún se necesita otro marcador para mejorar la probabilidad de diagnóstico. Por tanto, para desarrollar un marcador biológico para el cáncer de hígado en un estadio temprano, los presentes inventores han analizado los perfiles de expresión génica para 40 casos de tejidos con carcinoma hepatocelular y tejidos sin carcinoma hepatocelular por un procedimiento de micromatriz de ADNc, y han seleccionado un gen de proteína secretora que se expresa diferencialmente en tejidos con carcinoma hepatocelular, y a continuación lo sometieron a cribado. Han encontrado que se puede usar cistatina B (cistatina B, CSTB) como marcador de diagnóstico para el cáncer de hígado en un estadio temprano, completando de este modo la presente invención.

Divulgación

Solución técnica

55 Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular que comprende las etapas de:

poner en contacto un material específico para un gen CSTB o una proteína CSTB con una muestra biológica y

comparar un nivel de expresión del gen CSTB o la proteína CSTB en la muestra biológica con el de una muestra de

control,

en el que el material específico para un gen CSTB es un cebador sentido y antisentido o una sonda complementaria para el ARNm del gen CSTB y en el que el material específico para la proteína CSTB es un anticuerpo específico para la proteína CSTB.

- 5 En otro objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para determinar la progresión o pronóstico de carcinoma hepatocelular usando el procedimiento de la invención.

Descripción de los dibujos

10 La Fig. 1 es el resultado (superior) de la expresión de ARNm de cistatina B que se mide en 30 casos de tejidos sin carcinoma hepatocelular (N) y tejidos con carcinoma hepatocelular (T) por transferencia northern, y el histograma (inferior) que muestra que se amplifica su cantidad, en comparación con tejidos sin carcinoma hepatocelular.

15 La Fig. 2 muestra el resultado de micromatriz de 40 casos de tejidos con carcinoma hepatocelular y los correspondientes tejidos sin carcinoma hepatocelular. La Fig. 2a es el resultado de micromatriz que muestra análisis de agrupación jerárquica no supervisada de tejidos con carcinoma hepatocelular y tejidos sin carcinoma hepatocelular, y la Fig. 2b es un dendrograma que muestra dos categorías de tejidos sin carcinoma hepatocelular y tejidos con carcinoma hepatocelular.

20 La Fig. 3 es una fotografía de electroforesis obtenida a partir de RT-PCR que se realizó usando un cebador en 15 casos de tejidos con carcinoma hepatocelular (T), y los correspondientes tejidos sin carcinoma hepatocelular (N). La Fig. 3a es una fotografía de electroforesis obtenida a partir de RT-PCR que se realizó usando cebadores con SEQ ID NO.: 1 y SEC ID N.º: 3, y la Fig. 3b es una fotografía de electroforesis obtenida a partir de RT-PCR que se realizó usando cebadores con SEQ. ID. NO.: 2 y 4.

La Fig. 4 es el resultado de la transferencia de bandas western de CSTB usando el anticuerpo monoclonal RJMW2E7.

La Fig. 5 es el resultado de la inmunofluorescencia para el patrón de posición y expresión de CSTB en células.

25 La Fig. 6 es el resultado de la tinción inmunquímica para CSTB en tejidos con carcinoma hepatocelular y en tejidos sin carcinoma hepatocelular por un anticuerpo monoclonal RJMW2E7. A es hígado normal, B es un tejido con carcinoma hepatocelular teñido de forma selectiva por un anticuerpo CSTB, C es un tejido con carcinoma hepatocelular, en el que el antígeno CSTB es núcleo granulado o citoplasma, y D es un carcinoma hepatocelular invasivo, en el que CSTB está teñido en el núcleo y el citoplasma.

La Fig. 7 son los valores de CSTB sérico en personas sanas (G1), pacientes con hepatitis crónica no cirrótica (G2), pacientes con cirrosis (G3), y pacientes con carcinoma hepatocelular (G4).

30 La Fig. 8 es una curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) para los valores séricos de CSTB para distinguir el grupo de pacientes con carcinoma hepatocelular (G4) de la hepatopatía crónica no cancerosa (G2+G3).

La Fig. 9 es el resultado de una transferencia de bandas western, en la que se observa la expresión de la proteína CSTB en la línea celular Hep3B, en la que se introdujeron vectores de expresión génica CSTB recombinantes (CSTB11, CSTB17, CSTB18, CSTB28), y en la célula de control, en la que se introdujeron vectores vacíos (VC2, VC4).

35 Mejor modo

La presente invención se refiere a un marcador de diagnóstico novedoso para carcinoma hepatocelular que comprende un ácido nucleico o proteína de cistatina B (CSTB).

40 El término "diagnóstico" como se usa en el presente documento quiere decir confirmación de un estado patológico. Para el propósito de la invención, el diagnóstico es confirmar el desarrollo de carcinoma hepatocelular evaluando el nivel de expresión del marcador de diagnóstico para carcinoma hepatocelular.

45 El término "un marcador de diagnóstico, un marcador para diagnóstico o un marcador de diagnóstico" como se usa en el presente documento quiere decir un material que puede distinguir células de carcinoma hepatocelular de células normales, e incluye una biomolécula orgánica tal como un polipéptido, un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, etc.), un lípido, un glucolípido, una glucoproteína, y un azúcar (monosacárido, disacárido, oligosacárido, etc.), que se expresa a un nivel superior o inferior, en comparación con su nivel en células normales. El marcador de diagnóstico para carcinoma hepatocelular proporcionado en la presente invención es un gen CSTB y una proteína del mismo, que cada uno se expresa altamente en células de carcinoma hepatocelular, en comparación con células normales.

50 CSTB es un gen que codifica proteína, inhibidor de la tiol-proteinasa del hígado, y el ID génico de CSTB de Homo sapiens es 1476 (NCBI). La subfamilia de cistatina engloba proteínas que contienen múltiples secuencias de cistatina. Algunos de los miembros son inhibidores de cisteína proteasa activos, mientras que otros han perdido o quizás nunca adquirieron esta capacidad inhibidora. Existen tres familias inhibidoras en la subfamilia, que incluyen la cistatina de tipo 1 (estefinas), cistatinas de tipo 2 y cininógenos, y el CSTB de la invención es la cistatina de tipo 1 (estefinas).

El gen CSTB codifica una estefina que funciona como un inhibidor de tiol-proteasa intracelular. La proteína puede formar un dímero estabilizado por fuerzas no covalentes, que inhibe papaína y catepsinas 1, h y b. Se cree que la proteína desempeña un papel en la protección frente a las proteasas que sales de los lisosomas. Las pruebas indican que las mutaciones en este gen son responsables de los defectos primarios en pacientes con epilepsia mioclónica progresiva. Sin embargo, la correlación entre la proteína y el carcinoma hepatocelular no es bien conocida;

En la presente invención, se encontró que CSTB se usaba como un marcador de diagnóstico temprano para carcinoma hepatocelular, en el que se confirmaron un incremento en el nivel de ARNm de CSTB del tejido y fluido corporal y un incremento en el nivel proteico de antígeno de fluido corporal tal como suero y similares, que se obtuvieron a partir de un grupo de control, un grupo de hepatitis crónica, un grupo de cirrosis crónica, y un grupo de carcinoma hepatocelular.

En el presente documento se describe una composición de diagnóstico para carcinoma hepatocelular que comprende un ácido nucleico que puede evaluar el nivel de expresión de la proteína CSTB, o un gen que codifica la misma.

En la invención, el ácido nucleico quiere decir un material que puede evaluar el nivel de expresión de la proteína CSTB, o un gen que codifica la misma, preferentemente el nivel de ARNm del gen CSTB, y el material incluye un par de un cebador o una sonda específico para el gen CSTB. La expresión de la proteína CSTB se puede medir eficazmente en el nivel de ARNm usando un par de un cebador o una sonda específico para el gen CSTB. Los expertos en la técnica pueden diseñar un cebador o sonda que amplifique específicamente la región específica de un gen que tiene una secuencia conocida, en particular un gen CSTB, por NM-1476 (NCB1).

El "cebador" en el presente documento quiere decir una hebra de ácido nucleico corta que tiene un grupo 3-hidroxilo, que puede formar un par de bases con un molde complementario, y funciona como punto de partida para amplificar el molde. El cebador puede iniciar la síntesis de ADN en presencia de un reactivo para la polimerización en una solución tampón adecuada, a una temperatura adecuada (ADN polimerasa, o transcriptasa inversa) y cuatro dNTP diferentes (desoxinucleósido trifosfatos). El cebador de la invención es un cebador específico para cada gen CSTB marcador, preferentemente una hebra sentido (directo) y antisentido (inverso) que tiene una secuencia de 7 a 50 nucleótidos. Las aplicaciones adicionales se pueden incorporar sin cambiar su propiedad que funciona como un punto de partida para la síntesis de ADN. Además, la secuencia cebadora de la invención puede incluir una etiqueta que se puede detectar directa o indirectamente por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, o químicos. Los ejemplos de la etiqueta incluyen enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), radioisótopo (por ejemplo, ³²P), colorantes fluorescentes, y grupo químico (por ejemplo, biotina). Un par de cebador de la invención incluye todas las combinaciones de cebadores que consisten en cebadores directo e inverso, preferentemente un par de cebador que den un resultado de análisis con especificidad y sensibilidad.

La "sonda" en la presente invención quiere decir un fragmento de ácido nucleico tal como ARN o ADN, que es de varios cientos de pares de bases que puede unirse a ARNm específicamente, y se marca para confirmar la presencia de ARNm específico. La sonda se puede preparar en forma de sonda de oligonucleótidos, sonda de ADN monocatenario, sonda de ADN bicatenario, sonda de ARN o similares.

El cebador o la sonda usados en el procedimiento de la invención se pueden sintetizar químicamente usando un procedimiento de soporte sólido de fosforamidita u otro procedimiento convencional. La secuencia del ácido nucleico también se puede modificar usando el procedimiento conocido en la técnica. Los ejemplos de la modificación incluyen, pero sin limitación, metilación, tapado, sustitución con uno o más homólogos de nucleótido natural, y modificación entre nucleótidos, por ejemplo, modificación a un enlazador no cargado (por ejemplo, metilfosfonato, fosfotriéster, fosforoamidato, y carbamato) o enlazador cargado (por ejemplo, fosfortioato, fosforoditioato).

La secuencia del gen diana ya se conoce, y los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las diversas combinaciones de pares de cebadores que tienen alta especificidad y sensibilidad, considerando una variable tal como la hibridación de secuencia en el gen diana en base a la base de datos convencional. En un modo de realización específico de la invención, se evaluó la expresión del gen CSTB en el nivel de ARNm usando cebadores de SEQ ID NO.: 1, 2, 3, y 4.

En la presente invención, los ejemplos del material que puede evaluar el nivel de expresión de la proteína CSTB incluyen un "anticuerpo" tal como un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, y un anticuerpo recombinante, de los que cada uno se une específicamente a la proteína CSTB. Como se describe anteriormente, se ha descubierto una proteína marcadora de diagnóstico para cáncer de hígado, de modo que los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente el anticuerpo usando la proteína marcadora de diagnóstico para cáncer de hígado por un procedimiento conocido. El anticuerpo policlonal se puede preparar por un procedimiento conocido en la técnica, en el que el antígeno de CSTB se inyecta a un animal, y después se recoge la sangre del animal para obtener el suero que contiene el anticuerpo. El anticuerpo policlonal se puede generar en cualquier huésped animal que incluye cabras, conejos, oveja, mono, caballo, cerdo, ganado vacuno, perro y similares. El anticuerpo monoclonal se puede preparar por un procedimiento conocido en la técnica tal como un procedimiento con hibridoma (véase, Kohler y Milstein (1976), *European Journal of Immunology* 6: 511-519), y una colección de anticuerpos en fagos (Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:5 8, 1-597, 1991).

Además, el anticuerpo usado en el procedimiento de la invención es una forma completa que tiene dos cadenas ligeras de longitud completa, y dos cadenas pesadas de longitud completa, así como un fragmento funcional. El fragmento funcional de la molécula de anticuerpo quiere decir un fragmento que tiene una función de unión a antígeno al menos, tal como Fab, F(ab'), F(ab')₂, y Fv.

- 5 También se describe en el presente documento un kit de diagnóstico para carcinoma hepatocelular que comprende la composición de diagnóstico para carcinoma hepatocelular que puede evaluar el nivel de expresión de la proteína CSTB, o un gen que codifica la misma.

El kit de diagnóstico descrito en el presente documento puede comprender además uno o más tipos de composición, una solución, o un aparato, que sean adecuados para el procedimiento de análisis. El kit de diagnóstico se refiere a un kit para detectar el marcador de diagnóstico que comprende factores esenciales para realizar la RT-PCR. El kit de RT-PCR puede incluir pares de cebadores específicos para el gen marcador, así como un tubo de ensayo o un recipiente adecuado, un tampón de reacción (varios pH y concentraciones de magnesio), desoxinucleótidos (dNTP), una enzima tal como una Taq-polimerasa y una transcriptasa inversa, un inhibidor de DNasa, un inhibidor de RNasa, agua DEPO, agua esterilizada, o similares. El kit de RT-PCR puede incluir además pares de cebadores específicos para un gen, que se usa como control cuantitativo. Además, el kit de diagnóstico puede ser preferentemente un chip de ADN que comprende factores esenciales para realizar una micromatriz. El chip de ADN puede incluir un sustrato al que se une un gen o un ADNc o oligo-base correspondiente al fragmento del mismo.

Además, en el caso en el que el material para evaluar el nivel de proteína es preferentemente sea un anticuerpo, el kit de diagnóstico puede ser un kit de diagnóstico que comprende factores esenciales para llevar a cabo un ELISA. El kit ELISA puede incluir un reactivo que detecte el anticuerpo unido, tal como un anticuerpo secundario marcado, un cromóforo, una enzima (por ejemplo, conjugación con un anticuerpo), y un sustrato del mismo, y además incluir un anticuerpo específico para la proteína de control cuantitativa.

En otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular, o un procedimiento para determinar la progresión o pronóstico de carcinoma hepatocelular, en el que se evalúa el nivel de expresión del gen CSTB o la proteína CSTB.

Más específicamente, el nivel de expresión del gen se puede evaluar en el nivel del ARNm o proteína, lo que se puede realizar por una técnica conocida para aislar el ARNm o proteína, a partir de una muestra biológica usando un procedimiento conocido.

La "muestra biológica" como se usa en el presente documento incluye una muestra tal como tejidos, células, sangre, sueros, plasma sanguíneo, saliva, flema, líquido cefalorraquídeo u orina, en la que el nivel de expresión diferente del gen CSTB se evalúa por la aparición de carcinoma hepatocelular, pero no se limitan a esto.

Los ejemplos del procedimiento de análisis para evaluar el nivel de ARNm incluyen RT-PCR, RT-PCR competitiva, RT-PCR en tiempo real, ensayo de protección de RNasa, transferencia northern, o chip de ADN, pero no se limitan a eso. El nivel de expresión de ARNm en el control y en el paciente con carcinoma hepatocelular o presunto paciente con carcinoma hepatocelular se puede evaluar a través del procedimiento de análisis, y el desarrollo de carcinoma hepatocelular se puede pronosticar midiendo el nivel de expresión significativo de ARNm, en comparación con el control.

En el caso de usar el anticuerpo para evaluar el nivel de la proteína CSTB, la proteína marcadora CSTB y un anticuerpo específico para ella en la muestra biológica forma un complejo, que se denomina "complejo antígeno-anticuerpo" en la invención.

La cantidad del complejo antígeno-anticuerpo se puede medir cuantitativamente por el tamaño de señal de una etiqueta de detección. La etiqueta de detección se puede seleccionar del grupo que consiste en una enzima, un material fluorescente, un ligando, un material luminiscente, una micropartícula, una molécula redox, y un radioisótopo, pero no se limitan a eso.

En un modo de realización específico de la invención, el incremento en la expresión de ARNm del gen CSTB en un tejido se observó por un procedimiento de micromatriz de ADNc, y análisis de transferencia northern, la proteína de secreción de CSTB en el suero se midió por un ELISA de tipo sándwich. Además, la correlación entre el incremento en la expresión del antígeno de CSTB y el desarrollo de carcinoma hepatocelular se estudió realizando inmunohistoquímica en el antígeno de CSTB en el tejido.

El auto-radiograma de transferencia northern se escaneó para medir la fuerza de la señal usando un sistema LAS3000 (Fuji photo-film, Japón), para preparar un análisis cuantitativo y estadístico. El nivel de expresión del tejido con carcinoma hepatocelular se normalizó con el nivel de expresión de ARNr 18S, en base al tejido sin carcinoma hepatocelular. El valor medido de CSTB entre cada grupo se midió por una prueba de la T para datos independientes o una prueba Mann-Whitney. Con $P < 0,05$, se determinó el estándar significativo. Para determinar el valor de corte de CSTB o AFP, se realizó un análisis de curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) usando un programa informático MedCalc. El valor de corte óptimo de CSTB y AFP con la mejor precisión de diagnóstico se determinó automáticamente en el punto de suma mínima de tasas de falso-positivo y falso-negativo por el programa MedCalc.

Cada valor de diagnóstico total se representó por el área debajo de la curva (ROC).

Los pacientes se pueden diagnosticar según tengan carcinoma hepatocelular o no, y se puede determinar la progresión o pronóstico de carcinoma hepatocelular, comparando los niveles de expresión del gen en el control normal con los del presunto paciente con carcinoma hepatocelular por medio de procedimiento de análisis mencionado anteriormente.

También se describe en el presente documento un procedimiento para cribar el inhibidor de expresión de CSTB, lo que implica comparar los niveles de expresión del ARNm, o proteína en una línea celular sobreexpresada de CSTB, en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante, una línea celular, que se ha tratado con un candidato de un inhibidor de expresión de CSTB, y los de un control.

El "vector recombinante" como se usa en el presente documento es un vector que puede expresar una proteína diana o ARN diana en una célula huésped adecuada, y una construcción génica que contiene factores reguladores esenciales para intervenir en la expresión de la inserción. "Enlazado de forma funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora que regula la expresión de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína diana o ARN para realizar las funciones generales. Por ejemplo, un promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína diana o ARN se unen de forma funcional para afectar a la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína diana o ARN. El enlace funcional con el vector recombinante se puede preparar usando el procedimiento recombinante génico conocido en la técnica, el enlace y la escisión de ADN específico de sitio se realizan con las enzimas conocidas en la técnica.

Los ejemplos del vector incluyen un vector de plásmido, un vector cósmido, un vector bacteriófago, y un vector de virus, pero no se limitan a eso. Preferentemente, los ejemplos del vector de expresión incluyen elementos reguladores tales como un promotor, un operador, un codón de iniciación, un codón de terminación, una señal de poliadenilación, y un potenciador, así como una secuencia señal para la dirección o secreción de membrana, o una secuencia líder, y se puede preparar de forma muy diversa de acuerdo con este fin. El promotor del vector puede ser constitutivo o inducible. Además, el vector de expresión incluye un marcador selectivo para la selección de una célula huésped que tenga el vector, y el vector de expresión duplicable incluye el origen de duplicación.

En el caso en el que la célula huésped sea una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, la secuencia señal es una secuencia señal PhoA, una secuencia señal OmpA o similares. En el caso en el que la célula huésped sea una bacteria que pertenece al género *Bacillus*, la secuencia señal es una secuencia señal -amilasa, una secuencia señal subtilisina o similares. En el caso en el que la célula huésped sea levadura, la secuencia señal es una secuencia señal MF, una secuencia señal SUC2 o similares. En el caso en el que la célula huésped sea una célula de mamífero, la secuencia señal es una secuencia señal de insulina, una secuencia señal de -interferón, una secuencia señal de molécula de anticuerpo o similares, pero no se limita a eso.

Un procedimiento de transformación incluye cualquier procedimiento para introducir el ácido nucleico en una célula, un tejido o un órgano de un organismo, y se puede realizar empleando la tecnología estándar preferente de acuerdo con la célula huésped como es conocido en la técnica. Los ejemplos del mismo incluyen una electroporación, una fusión citoplásmica, fosfato de calcio (CaCl_2), una precipitación, una transformación mediada por fibra de carburo de silicio, una transformación mediada por agrobacteria, PEG, sulfato de dextrano, y lipofectamina, pero no se limitan a eso.

La cantidad de expresión y modificación son diferentes de acuerdo con la célula huésped, y la célula huésped más preferente se selecciona y se usa de acuerdo con este fin. Los ejemplos de la célula huésped incluyen una célula procariota tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Prometeus mirabilis* o *Staphylococcus*, pero no se limitan a eso. Además, una célula eucariota inferior tal como hongo (por ejemplo, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, y *Neurospora crassa*), y una célula derivada de una célula eucariota superior que incluye una célula de insecto, una célula de planta, y una célula de mamífero, se pueden usar como la célula huésped.

En ejemplos específicos de la invención, se proporciona una línea celular Hep3B que sobreexpresa la proteína CSTB, que se transforma por el vector recombinante. La línea celular Hep3B es una célula cancerosa hepática humana, que sobreexpresa la proteína CSTB de acuerdo con la invención. La línea celular Hep3B se trata con el inhibidor de la expresión de CSTB, y a continuación se observa el patrón de expresión. Como resultado, en el cribado se puede usar un agente antineoplásico que inhibe el carcinoma hepatocelular.

El procedimiento para el cribado del inhibidor de la expresión de CSTB descrito en el presente documento comprende las etapas de cultivar las células que expresan la proteína CSTB, tratar las células con un candidato de inhibidor de la expresión de CSTB, y compararlo con el nivel de expresión del marcador de diagnóstico para carcinoma hepatocelular (proteína, ARNm) en una célula de control, que no está tratada con los candidatos. Se puede buscar el agente antineoplásico, que puede inhibir la expresión de CSTB, y tratar eficazmente el cáncer de hígado, usando el procedimiento de cribado de la invención.

Como procedimiento de cribado, se puede usar un procedimiento para medir el nivel de expresión del gen CSTB, preferentemente el nivel de ARNm usando un cebador o sonda. Entre ellos, se prefiere un procedimiento de RT-PCR. El inhibidor que puede reducir la expresión del marcador de diagnóstico, que se compara con la célula de control, se somete a cribado para usarse en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

También se describe en el presente documento una composición preventiva o terapéutica para carcinoma hepatocelular que comprende el inhibidor de expresión de CSTB. Se describe específicamente en el presente documento una composición preventiva o terapéutica para carcinoma hepatocelular que comprende el inhibidor de expresión de CSTB que incluye un ARN antisentido complementario y una hebra de ARN sentido complementario para el ARNm del CSTB, y comprende ARNip que induce interferencia en el ARN, que es específico para el CSTB, y una composición preventiva o terapéutica para carcinoma hepatocelular que comprende anticuerpos, que son específicos para la proteína CSTB.

El término "ARNip" como se usa en el presente documento quiere decir un ARN bicatenario que puede inducir interferencia en ARN (ARNi) por medio de la escisión de ARNm del gen diana, que consiste en una hebra de ARN sentido que tiene una secuencia homóloga con ARNm del gen diana y una hebra de ARN antisentido que tiene una secuencia complementaria a la hebra de ARN sentido. El ARNip puede inhibir la expresión del gen diana, que se puede proporcionar como un procedimiento de inactivación génica o tratamiento génico.

El ARNip no está limitado a la región de ARN bicatenario completamente apareado con los ARN, y puede incluir la región a ARN bicatenario que no está completamente apareada por la presencia de emparejamiento erróneo (la base correspondiente no es complementaria), protuberancia (la base correspondiente no está presente en una hebra) o similares. La longitud total del es de 10 a 80 pares de bases, preferentemente de 15 a 60 pares de bases, más preferentemente de 20 a 40 pares de bases. La estructura de los extremos de ARNip puede ser un extremo romo o un extremo cohesivo. El extremo cohesivo puede tener un extremo que sobresale en el extremo terminal 3 y extremo terminal 5, y el número de la base que sobresale no está limitado. Por ejemplo, el número de la base puede ser de 1 a 8 bases, preferentemente de 2 a 6 bases. Además, el ARNip puede incluir, en lo referente al mantenimiento del efecto de inhibición de la expresión del gen diana, por ejemplo ARN de bajo peso molecular (por ejemplo, ARN natural tal como ARNt, ARNr, ARN de virus o ARN artificial) en el extremo que sobresale de un extremo terminal. No es necesario que la estructura de los extremos del ARNip tenga estructuras de escisión en ambos extremos, y puede ser una estructura de tipo tallo-lazo en la que un extremo del ARN bicatenario está conectado por un ARN enlazador. La longitud del enlazador no está limitada, siempre que la longitud no dificulte el apareamiento de bases del tallo. El procedimiento para preparar ARNip es un procedimiento en el que se sintetiza ARNip *in vitro*, y después se transfecta en las células, y un procedimiento en el que un vector de expresión de ARNip que expresa ARNip en las células o un casete de expresión de ARNip derivado de PCR se transfiere en las células por suministro o transducción génica.

El término "específico" como se usa en el presente documento quiere decir la capacidad para inhibir sólo el gen diana sin afectar a otros genes en las células, y el ARNip es específico para el CSTB en la presente invención.

El ARNip de la presente divulgación puede reducir el ARNm de CSTB específicamente, y su secuencia y longitud no están limitados. La composición que comprende el ARNip específico para el gen puede incluir un material adicional que inhibe la muerte celular, e incluir una preparación que promueva la entrada de ARNip en las células. La preparación que promueve la entrada de ARNip en las células, en general, puede usar una preparación que promueve la entrada de ácido nucleico. Por ejemplo, puede usar liposoma y mezclarse con un transportador lipófilo seleccionado de esteroides tales como colesterol, colato, y desoxicolato. Además, se puede usar un polímero catiónico tal como poli-L-lisina, espermina, polisilazano, polietilenimina (PEI), polidihidroimidazoleno, polialilamina, y quitosano, y un polímero aniónico tal como PLL succinilado, PEI succinilado, ácido poliglútamico, ácido poliaspártico, ácido poliacrílico, polimetacrílico, sulfato de dextrano, heparina, y ácido hialurónico.

Si el anticuerpo específico para la proteína CSTB se usa como un anticuerpo terapéutico, el anticuerpo se puede acoplar (por ejemplo, unido covalentemente) con un agente terapéutico convencional directa o indirectamente por medio de un enlazador. Los ejemplos del agente terapéutico que puede acoplarse con el anticuerpo incluyen un radionucleido, un fármaco, una linfocina, una toxina, un anticuerpo heterofuncional, pero no se limitan a eso. (1) un radionucleido tal como ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ²¹²Bi, ²¹¹At, ⁶⁷Ga, ¹²⁵I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵³Sm, ¹²³I, y ¹¹¹In, (2) una modificación biológica o fármaco que incluye linfocina tal como metotrexato, adriamicina, e interferón, (3) una toxina tal como ricina, abrina, y difteria, (4) un anticuerpo heterofuncional, un anticuerpo que se une a otro anticuerpo para formar un complejo, esto es, un complejo que puede unirse tanto a células cancerosas como a células efectoras (por ejemplo, una célula citolítica tal como un linfocito T), y (5) un anticuerpo natural, no asociado o no complejo.

Se puede administrar el anticuerpo, como es, o una composición que comprende el anticuerpo.

La composición terapéutica se puede preparar con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con su ruta de administración. La ruta administración preferente es bien conocida, y se incluye un tensioactivo que facilita el transporte de membrana. El tensioactivo se puede inducir de esteroide o puede ser un lípido catiónico tal como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil(propil)-N,N,N-trimetilammonio (DOTMA), o varios compuestos tales como hemisuccinato de colesterol y fosfatidilglicerol.

La composición que comprende el anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para tratar células cancerosas o sus metástasis.

La composición farmacéutica se puede administrar individualmente o en combinaciones. La composición que

comprende el anticuerpo se administra por medio de una vía subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar o intranasal, si fuera necesario para el tratamiento inmunosupresor, por cualquier procedimiento adecuado que incluye readministración para la lesión. Los ejemplos de inyección parenteral incluyen administraciones intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La ruta de administración y preparación preferentes es una preparación intravenosa, subcutánea, intracutánea, intramuscular, o de gota. El pH de la preparación puede ajustar la estabilidad del anticuerpo (estabilidad química y física) para modificar otra tecnología adecuada para la administración, pudiendo de este modo diseñar otra preparación adecuada. El nivel de cantidad típico para la administración se puede optimizar usando un procedimiento estándar. Además, el anticuerpo de la invención se administra en forma de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, para generar el anticuerpo en las células (documento WO96/07321).

10 Modo para la invención

A continuación en el presente documento, se describirá con más detalle la presente invención con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos sólo son con fines ilustrativos, y no se pretende limitar la invención por estos ejemplos.

15 (Ejemplo 1) Aislamiento de ARN total a partir de tejido con carcinoma hepatocelular y tejido sin carcinoma hepatocelular

Se retiraron tejidos con carcinoma hepatocelular y tejidos circundantes sin carcinoma hepatocelular de 40 pacientes con carcinoma hepatocelular por una operación quirúrgica para llevar a cabo el estudio, y el presente estudio se aprobó por el Research Ethics Committee en la Chonbuk National University. Los 40 pacientes con carcinoma hepatocelular se sometieron a la operación quirúrgica para tratamiento curativo, y el tejido con carcinoma y el tejido cirrótico circundante se obtuvieron a partir del tejido hepático retirado. Se recogieron los consentimientos por escrito y se confirmaron histológicamente el tejido con carcinoma hepatocelular y el tejido sin carcinoma hepatocelular por un anatomopatólogo. Después de retirar los tejidos, se lavaron los tejidos con un tampón de fosfato esterilizado, y después se almacenaron en un depósito de nitrógeno para el aislamiento adicional de los ARN totales. Los ARN totales se extrajeron con un kit Trizol (MRC Co., EE. UU.), y se confirmó la calidad usando electroforesis. Se fijaron algunos de los tejidos retirados en un tampón de formalina al 10 %, y se incrustaron en parafina para realizar el análisis histopatológico estándar. Se realizó el protocolo de acuerdo con el código de ética del Research Ethics Committee, y se extrajeron los ARN totales a partir de los tejidos con carcinoma hepatocelular y los tejidos circundantes sin carcinoma hepatocelular usando una solución de Trisol, respectivamente.

(Ejemplo 2) Obtención de perfil génico de carcinoma hepatocelular

30 Los ARN totales de los tejidos con carcinoma hepatocelular y los tejidos sin carcinoma hepatocelular extraídos en el ejemplo 1 se hibridaron con aproximadamente 3000 genes en la micromatriz de ADNc, y a continuación se preparó ADNc marcado fluorescentemente para dividir dos grupos principales por análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado. Se identificó un gen para discriminar entre tejidos sin carcinoma hepatocelular y tejidos con carcinoma hepatocelular en un 1 % o menos de FDR (tasa de descubrimiento falso) por un programa estadístico.

35 Se extrajeron los ARN totales de los tejidos con carcinoma hepatocelular y los tejidos circundantes sin carcinoma hepatocelular usando la solución de Trisol, y a continuación se preparó ADNc marcado fluorescentemente para hibridar con la micromatriz. Se disolvieron 100 µg de los ARN totales aislados en 14 µl, y después se añadió a esto transcriptasa SuperSript II, 0,5 mM de dATP, dGTP, dCTP, y 0,2 mM de dTTP. Se añadieron a esto 0,1 mM de Cy5-dUTP o Cy3-dUTP para realizar el marcado en 40 µl del volumen final durante 2 horas a 42 °C, y a continuación se añadieron 5 µl de EDTA 500 mM para terminar el marcado. Se añadieron 10 µl de NaOH 1N al ARN no marcado, para hidrolizar durante 30 minutos a 65 °C. Se añadieron a esto 25 µl de Tris HCl (pH 7,5), y se neutralizó para retirar las bases no marcadas y sales usando una columna Biospin 6. Las sondas marcadas se precipitaron con isopropanol, y después se disolvió en un tampón de hibridación. Las sondas disueltas se colocaron sobre un portaobjetos, y después se cubrió con un HybriSlip para colocarlo en una cámara de hibridación a 65 °C durante la noche para reacción. Después de la hibridación, se lavaron los portaobjetos con tampón 1 SSC/SDS al 0,1 %, 0,1 SSC/SDS (50) al 0,1 %, y 0,1 SSC durante 10 minutos, respectivamente. Se escanearon los portaobjetos terminados usando el programa Quantarray y se analizaron usando el programa de Biodiscovery ImaGene 4.2.

La fuerza fluorescente de Cy5 y Cy3 llevó una corrección de fondo local usando el programa ImaGene, para normalizar usando puntos totales. El análisis cualitativo de los puntos se realizó usando el siguiente criterio. Los puntos que pasan el criterio en el que la señal media es 1,5 veces más que el fondo local se usan en el análisis, entre los puntos de los que el valor de media de señal-media de fondo/fondo es $DE > 2,0$ o más. El criterio se aplicó de forma idéntica a todos los análisis de portaobjetos.

55 Se analizó la clasificación de cáncer con Cluster y TreeView disponible en el sitio web. Se usaron los factores de matriz que se pueden medir a un 80 % o más en las muestras usadas para el análisis. Antes del análisis, se ajustaron las proporciones de fluorescencia de cada punto por transformación logarítmica, y se realizó una mediana del centrado para eliminar los márgenes de error experimentales. Se realizó el análisis estadístico usando el programa SAM (análisis de significancia de micromatriz), y se puntuaron los genes significativos. Los genes, que se expresaron en un 80 % o más en los tejidos con carcinoma hepatocelular y los tejidos sin carcinoma hepatocelular, se cribaron para

ES 2 429 101 T3

intentar un análisis de agrupamiento jerárquico para todos los tejidos, en base a la similitud del patrón de expresión de genes totales.

- 5 Se dividieron todos los tejidos en un gran agrupamiento de tejido canceroso y uno no canceroso, y sólo un caso de los tejidos sin carcinoma hepatocelular perteneció al agrupamiento con carcinoma hepatocelular. Se sobreexpresaron 248 genes y se subexpresaron 149 genes en los tejidos con carcinoma hepatocelular, en comparación con los tejidos sin carcinoma hepatocelular. Entre ellos, los primeros 20 genes, que se expresan diferencialmente en los que tienen carcinoma hepatocelular y los que no tienen carcinoma hepatocelular, se enumeran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1

ID de gen	Anotación	Símbolo	Cambio en veces medio	Valor p	Valor q
Hs.44532	Ubiquitina D	UBD	2,5851522	1,00E-04	0,00016
Hs.3136	Proteína cinasa, subunidad no catalítica gamma 1, activada con AMP	PRKAG1	2,2441856	1,00E-04	0,00016
Hs.695	Cistatina (estefina B)	CSTB	2,1175641	1,00E-04	0,00016
Hs.507	Candidato 1 de susceptibilidad a psoriasis 1	PRORS1C1	2,0031053	1,00E-04	0,00016
Hs.11083	Tubulina, beta, 5	TUBB5	1,9962115	1,00E-04	0,00016
Hs.62914	Secuencias transcritas		1,981338	1,00E-04	0,00016
Hs.3459	Similar proteína de unión a ubiquitina	UBPH	1,9463814	1,00E-04	0,00016
Hs.111779	Proteína secretada, ácida, rica en cisteína (osteonectina)	SPARC	1,8742631	1,00E-04	0,00016
Hs.161357	Piruvato deshidrogenasa (lipoamida) beta	PDHB	1,8638526	1,00E-04	0,00016
Hs.93379	Factor de iniciación de traducción eucariota 4B	EIF4B	1,8629581	1,00E-04	0,00016
Hs.1710	Casete de unión a ATP, sub-familia B (MDR/TAP), miembro 10	ABCB10	1,8350107	1,00E-04	0,00016
Hs.30340	Proteína 2 interaccionante con la familia Nedd4	NDFIP2	1,8060788	1,00E-04	0,00016
Hs.90436	Antígeno 7 asociado a esperma	SPAG7	1,8000763	0,0078	0,00661
Hs.10842	RAN, miembro de familia del oncogén RAS	RAN	1,7669291	1,00E-04	0,00016
Hs.111244	Transcripción inducible-daño-ADN	DDIT4	1,7596031	1,00E-04	0,00016
Hs.8102	Proteína ribosómica S20	RPS20	1,7239815	1,00E-04	0,00016
Hs.62595	Marco de lectura abierto de cromosoma 9	C9orf9	1,6816082	2,00E-04	0,000285
Hs.72242	Familia de dominio TBC1, miembro 14	TBC1D14	1,6555126	1,00E-04	0,00016
Hs.108966	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-cinasa, tipo II, alfa	PIP5K2A	1,64066334	1,00E-04	0,00016
Hs.157607	Nexina de clasificación 22	SNX22	1,6269205	1,00E-04	0,00016

Tabla 2

ID de gen	Anotación	Símbolo	Cambio en veces medio	Valor p	Valor q
Hs.1290	Componente de complemento 9	C9	6,157514	1,00E-04	0,00016
Hs.75183	Citocromo P450, familia 2, subfamilia E, polipéptido 1	CYP2E1	3,580571	1,00E-04	0,00016
Hs.85155	Proteína de dedos de cinc36, C3H similar a tipo 1	ZFP36L1	3,015888	1,00E-04	0,00016
Hs.1282	Componente de complemento 6	C6	2,956622	1,00E-04	0,00016
Hs.80756	Hetaína-homocisteína metiltransferasa	BHMT	2,846807	1,00E-04	0,00016
Hs.165551	Flavoproteína oxidoreductasa MICAL3	MICAL3	2,786589	1,00E-04	0,00016
Hs.24583	Proteína hipotética DKFZp434C0328	DKFZp434C0328	2,739747	1,00E-04	0,00016
Hs.1051	Granzima B (granzima 2, serina estearasa 1 asociada a linfocito T citotóxica)	GZMB	2,701592	1,00E-04	0,00016
Hs.1872	Fosfoenolpiruvato carboxinasas 1 (soluble)	PCK1	-2,6855	1,00E-04	0,00016
Hs.10319	Familia de ODP glicosiltransferasa 2, polipéptido S7	UGT2B7	-2,5277	1,00E-04	0,00016
Hs.132230	Similar a fibronectina tipo 3 y proteína que contiene el dominio SPRY	MGC45564	2,382785	1,00E-04	0,00016
Hs.75275	Factor de ubiquitinación E4A (homólogo UFD2, levadura)	OBE4A	2,336673	1,00E-04	0,00016
Hs.92025	Producto génico KIAA0316	KIAA0316	2,310326	4,00E-04	0,000504
Hs.2523	Alcohol deshidrogenasa 1C (clase I), gamma polipéptido	ADH1C	2,295308	1,00E-04	0,00016
Hs.139876	Proteína ribosómica S9	RPS9	2,259602	1,00E-04	0,00016
Hs.135742	Sideroflexina 1	SFXN1	2,256822	1,00E-04	0,00016
Hs.36793	Transportador de soluto familia 12 (transportadores potasio/cloruro),	SLC12A8	-2,21657	1,00E-04	0,00016
Hs.93194	Apolipoproteína A-I	APOAI	2,180906	1,00E-04	0,00016
Hs.69771	B-factor, properdina	BF	2,155754	1,00E-04	0,00016
Hs.37	Acetil-coenzima A acetiltransferasa (acetoacetil Coenzima A tiolasa)	ACAT1	2,148807	1,00E-04	0,00016

Es un valor de diagnóstico crítico que CSTB, un gen que codifica una proteína secretora, se sobreexpresa en los tejidos con carcinoma hepatocelular. Por tanto, se observó que se evaluó la expresión de ARN y proteína de CSTB en una muestra biológica que incluye tejido y fluido corporal, usándolo de este modo como índice de diagnóstico y pronóstico para carcinoma hepatocelular.

5

(Ejemplo 3) Análisis de expresión de CSTB en el grupo sin carcinoma hepatocelular correspondiente al grupo de carcinoma hepatocelular

(1) Análisis de transferencia northern

5 Se cargó una muestra que contenía 20 ug de ARN totales de tejidos con carcinoma hepatocelular y sin carcinoma hepatocelular en agarosa al 1 % que contenía formaldehído al 2,2 % y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico 50 mM (MOPS) y a continuación se transfirió a una membrana de nailon para tratar con reticulador UV (stratagem Co.,EE.UU.). Se hibridó la banda con 2×10^6 cpm/ml de sonda de ADNc de CSTB marcada con [³²P]dCTP(NEN) por cebado aleatorio durante la noche, y después se lavó para exponerla a una película X-Cmat AR (Kodak) a -70 °C. Se quitó la banda y se rehibridó con el ADNc de gen de proteína ribosómica 18S como control de carga. Se descubrió que 10 el ARNm de CSTB se expresó diferencialmente en tejidos con carcinoma hepatocelular, en comparación con tejidos sin carcinoma hepatocelular por la transferencia northern (80 %) (Fig. 1). Se lavó la membrana para la transferencia northern y se rehibridó con ADNc 18S como sonda para su uso para la prueba de carga comparativa, y después se normalizó la expresión relativa de cada tejido canceroso respecto a tejido no canceroso con la expresión de 18S a determinar. El histograma inferior de la Fig. 1 muestra que el incremento en el nivel de ARNm de CSTB en carcinoma hepatocelular se normalizó con la cantidad de expresión de ARNm 18S para cuantificar en la proporción con respecto a tejidos sin carcinoma hepatocelular, en donde en 24 casos de 30 casos (80 %), el nivel de ARNm de CSTB en carcinoma hepatocelular se incrementó una o más veces que en tejido sin carcinoma hepatocelular.

La Fig. 2a muestra que se analizó el resultado de la micromatriz de los tejidos con carcinoma hepatocelular de 40 20 pacientes y los correspondientes tejidos sin carcinoma hepatocelular, con agrupamiento jerárquico no supervisado. Las columnas representan cada gen, y las filas representan los pacientes. El color rojo representa que el gen se sobreexpresó, el color verde representa que el gen se subexpresó, y la escala es una escala logarítmica basada en log2. El dendrograma en la Fig. 2b muestra dos categorías, esto es, sin carcinoma hepatocelular y con carcinoma hepatocelular. La mayoría de las regiones del gen CSTB en el tejido con carcinoma hepatocelular se observaron con el color rojo. Por tanto, se descubrió que CSTB se sobreexpresó en los tejidos con carcinoma hepatocelular.

25 (2) Amplificación de ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR)

Se extrajeron ARN totales con fenol y solución GTC (solución de tiocianato de guanidina, reactivo Tri; Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH) a partir de los tejidos o las líneas celulares cultivadas. Se añadieron a esto 40 u/μl de inhibidor de ARNasa para sintetizar ADNc. Se añadieron un volumen de 5 veces de tampón de transcriptasa inversa, 8 μl de cebador oligodecámero (500 ng/ml 4 μl), 3,2 μl de dNTP 250 uM y 2 μl de superscript RTasa (200 U/μl) al precipitado de ARNt, 37 °C y se sometió a reacción en 40 μl de volumen de reacción total a 37 °C durante 50 minutos para preparar ADNc. En base al ADNc, 2 μl de ADNc, cada 10 uM de cebador directo

(5'-GTCGCCCGCAAGATGATGTGC-3'; SEQ ID NO.: 1 o 5'-TGTCATTCAAGAGCCAGGTG-3'; SEQ ID NO.: 2) y cebador inverso (5'-GAMTAGCTCACJCTCATCATG-S1; SEQ ID NO.: 3 o 5'-GCTCTGGTAGACGGAGGATG-3'; SEQ ID NO.: 4) que contenía una región no traducida en 5' de ARNm de CSTB se añadieron a esto, y se mezclaron con 4 μl de dNTP 2,5 mM, 5 μl de tampón de transcriptasa inversa diez veces, 3 μl de MgCl₂ 10 mM, 0,5 μl de Taq polimerasa para que sea 50 °C del volumen de reacción total, y después se terminó la reacción. En este momento, se realizó la desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, y se realizaron 35 ciclos de desnaturalización (94 durante 1 minuto), apareamiento (50 °C durante 1 minuto) y extensión (72 °C durante 1 minuto) para completar la reacción. Se redisolviéron los productos de PCR en geles de agarosa al 2 %.

40 (3) Análisis de expresión de ARNm de CSTB por cebador de detección para expresión génica (SEQ ID NO.: 1 y 3, o SEQ ID NO.: 2 y 4)

Se extrajeron los ARNm de los tejidos con carcinoma hepatocelular y los correspondientes tejidos sin carcinoma hepatocelular para sintetizar ADNc usando oligonucleótido octámero aleatorio como cebador bajo transcriptasa inversa. Se realizó la PCR con el ADNc como molde, cebadores directo e inverso, y Taq polimerasa.

45 Como el resultado de PCR por el cebador directo que contenía una región no traducida en 5 de ARNm e CSTB con SEQ ID NO.: 1 y 3 y el cebador inverso que contenía una región traducida, el ARNm se expresó de forma selectiva sólo en los tejidos cancerosos (T). Por tanto, se observó una banda de 306 bases (Fig. 3a). Se descubrió que el ARNm de CSTB se sobreexpresó en 12 casos de 15 casos de carcinoma hepatocelular (80 %). Como resultado de la PCR por el cebador directo y cebador inverso que contenían una región traducida de ARNm de CSTB con SEQ ID NO.: 2 y 4, se observó una banda de 240 bases (Fig. 3b).

(4) Tinción inmunofluorescente de inmunotransferencia y tinción inmunoquímica

55 Se extrajo la proteína con Triton X-100 al 1 % que contenía aprotina (1 unidad de tripsina/ml), leupeptina (10 ug/ml), y pepstatina A (10 ug/ml) a partir de la célula o suero, y después se realizó SDS-PAGE. Se transfirió el gel electroforetizado a una membrana de nitrocelulosa, y se bloqueó la unión no específica con leche desnatada en polvo al 5 % en un tampón Tween 20 tris. Se añadió anticuerpo CSTB anti-humano, como anticuerpo primario, a la membrana, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se le añadió a esto una unión de anticuerpo secundario con enzima HRP, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una agente luminiscente,

ECL (Amersham Bioscience Co.) para detectar una señal de banda de proteína (Henikoff S, Gene(Amst) 1984; 28: 351-59). Se usó un anticuerpo monoclonal RJMW2E7 (LBS Co.) para detectar la proteína CSTB. Para determinar la especificidad inmunorreactiva de los anticuerpos a la proteína CSTB, se introdujo el vector de expresión de CSTB marcado con GFP o CSTB marcado con Myc en líneas celulares 293T, y se realizó la inmunotransferencia para analizar la inmunorreactividad de los anticuerpos. Se marcó el ADNc de CSTB introducido con proteína GFP o Myc en el extremo C terminal, y después se sometió a inmunotransferencia con anticuerpo anti-GFP (Santa Cruz, FL, EE. UU.) o anticuerpo anti-Myc (9E10, Santa Cruz). Se descubrió que un anticuerpo monoclonal de ratón, RJMW2E7 detecta específicamente una banda de CSTB (Fig. 4). Las flechas representan la proteína CSTB, y se descubrió que el anticuerpo monoclonal, RJMW2E7 se une específicamente a la proteína GSTB marcada con GFP o Myc.

De forma alternativa, como procedimiento de tinción inmunofluorescente, se introdujeron el vector de expresión de CSTB marcado con GFP (pEGFP-C2-CSTB) y el vector vacío de control (pEGFP-C2) en líneas celulares Hep3B y 293T, para determinar la inmunorreactividad del anticuerpo monoclonal, RJMW2E7. Para tinción inmunofluorescente, se cultivaron las células en cubreobjetos, y se introdujeron con un plásmido de CSTB marcado con GFP. Se realizó la prueba de control sólo con el vector. Se fijaron las células en paraformaldehído al 4 % para inducir transparencia con tampón fosfato que contenía triton al 0,2 %, y a continuación se bloqueó con BSA al 1 %. Después, se dejaron las células en el anticuerpo monoclonal de ratón, RJMW2EM, y adicionalmente se dejaron en TRITC (anticuerpo anti-ratón marcado con fluorescencia). Después de un lavado final, se tiñeron los núcleos de las células en 1 mg/ml de Hoechst 33258 durante 15 minutos, se montaron en glicerol al 50 %, y se observó en microscopía de barrido (LCM510 Zeiss, Alemania).

De la comparación de la imagen fluorescente y transparente, la expresión exógena de CSTB marcado con GFP se muestra en el núcleo o citoplasma, lo que es idéntico a un informe anterior, y se superpone completamente con la inmunorreactividad CSTB fluorescente rojo. Se descubrió que la expresión endógena de CSTB marcado con of GFP se muestra principalmente en el citoplasma por RJMW2E7 (Fig. 5). La inmunorreactividad de la proteína GFP y la proteína CSTB se superpone completamente. Como resultado, se puede observar que el anticuerpo RJMW2E7 tiene especificidad.

A continuación, se analizó la expresión de CSTB incrustado en parafina en el tejido sin carcinoma hepatocelular correspondiente al carcinoma hepatocelular usando el anticuerpo RJMW2E7.

Se realizó la inmunohistoquímica con un reactivo de inmunoestrepavidina-biotina-peroxidasa (Biomedica, Foster City, CA). Los tejidos normales y con carcinoma hepatocelular se fijaron en formalina al 10 % y se incrustaron en parafina, que es el procedimiento general para tratar un tejido patológico. Se retiró la parafina del tejido con xileno, y después se lavó con tampón tris 1 M para inactivar la peroxidasa endógena con ácido peryódico metanol a 40 °C durante 2 minutos. Las secciones de tejido se dejaron en el anticuerpo monoclonal de CSTB primario a 40 °C durante 9 minutos, y después se dejaron en biotina-inmunoglobulina anti-conejo a 40 °C durante 4 minutos. Después, se desarrollaron las secciones de tejido con 3-amino-9-etilcarbazol, peróxido de hidrógeno al 0,05 %, y un tampón de pH 5,2. Se tiñó el control negativo con un tampón de solución salina fisiológica o inmunoglobulina IgG1 de ratón en lugar del anticuerpo primario.

(A) en la Fig. 6, muestra un hígado normal negativo para CSTB que incluye célula hepática, vaso sanguíneo, y conducto biliar, y (B) muestra que el tejido con carcinoma hepatocelular se tiñe selectiva y fuertemente por el anticuerpo CSTB, en comparación con el tejido sin carcinoma hepatocelular, (c) es tejido con carcinoma hepatocelular positivo para CSTB que muestra que la proteína de antígeno de CSTB está granulada en el núcleo o citoplasma, y (D) es carcinoma hepatocelular invasivo que muestra la tinción de CSTB en el núcleo o citoplasma. Esto es, el CSTB se expresa de forma selectiva en el tejido con carcinoma hepatocelular. Se descubrió que las respuestas positivas se muestran en el citoplasma de la mayoría de los tejidos con carcinoma hepatocelular, y se muestran raramente en el citoplasma y el núcleo.

(Ejemplo 4) Medida del valor de CSTB sérico de acuerdo con el tipo de hepatopatía y su progresión

En base a datos demográficos y clínicos, se recogieron sueros de 4 grupos, en los que un grupo 1 (G1 es un grupo de personas sanas con signos bioquímicos normales y sin problemas de hepatopatía, un grupo 2 (G2) es un grupo de pacientes con hepatitis crónica no cirrótica, que está histológicamente confirmada, el grupo 3 (G3) es un grupo de pacientes con cirrosis con hepatopatía compensada y descompensada, que está histológica y clínicamente confirmada, y el grupo 4 (G4) es un grupo de pacientes con carcinoma hepatocelular, que está histológicamente confirmado.

La causa de hepatopatía subyacente se basa en la hepatitis B, en donde el antígeno de superficie de hepatitis B sérico es positivo, hepatitis C, en donde se detectaron el anticuerpo vírico de hepatitis C sérico y ARN vírico, y hepatopatía alcohólica, en donde los pacientes han bebido diariamente 40 g o más durante al menos 15 años. La hepatopatía, de la que la causa no está clara, se clasifica en una hepatopatía criptogénica. Se centrifugaron los sueros, y después inmediatamente se almacenaron a -20 °C.

El CSTB sérico se puede expresar de forma tóxica y sistémica en forma de proteína secretora de acuerdo con el patrón de expresión de tejido canceroso. Por lo tanto, se midieron los valores de CSTB sérico en 52 casos del grupo G1, 53

casos del grupo G2, 43 casos del grupo G3, y 62 casos del grupo G4 usando un procedimiento de ELISA de tipo sándwich. El resultado es un valor medio de dos medidas individuales, y la significancia estadística de los valores medios entre cada grupo se analizó por la prueba de Mann-Whitney. La significancia se determinó con $P < 0,05$. Los cuatro grupos se clasifican de acuerdo con el sexo, la edad y la causa. La edad de G2 a G4 es de 43,7 11,8 (media DE), 54,1 10,1, y 59,1 \pm 10,4 ($P < 0,016$), lo que quiere decir que el carcinoma hepatocelular se produce en el estadio terminal de la hepatopatía crónica, y la diferencia de la puntuación MELD no es obvia entre el grupo G3 y el grupo G4 (12,8 \pm 5,3; 12,4 \pm 6,3).

Los valores de CSTB del grupo G2, grupo G3, y grupo G4 fueron 3,3, 7,8, y 10,8 ng/ml ($P < 0,001$), respectivamente, y los valores se incrementaron significativamente. La diferencia en el grupo G1 y el grupo y G2 no fue obvia ($P = 0,8325$). Cada valor de CSTB del grupo G3 y grupo G4 se incrementó significativamente, en comparación con el grupo G2 ($P = 0,0128$ y $P < 0,001$), y el grupo G2 tuvo un valor de CSTB mayor que el del grupo G3 ($P = 0,0038$). El valor de CSTB en tejido con carcinoma hepatocelular se incrementó significativamente, en comparación con la hepatopatía no maligna, G2+G3. ($P = 0,001$) (Fig. 7).

En la Fig. 8, los valores séricos de CSTB se mostraron de forma comparativa por la curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) para distinguir G4, el grupo de pacientes con carcinoma hepatocelular de G2+G3.

A partir de la comparación de valores séricos entre el CSTB de la invención y la proteína fetal alfa (AFP), cada valor deseable fue de 5,34 ng/ml y 32,6 ng/ml. La sensibilidad y especificidad de CSTB fueron de un 84,4 % (95 %CI, 73,1 %-92,2 %) y un 53,1 % (15 %CI, 42,7 %-63,4 %), y las de AFP fueron de un 56,7 % (95 %CI, 43,3 %-68,8 %) y 87,5 % (95 %CI, 79,2 %-93,4 %), respectivamente. El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de CSTB fueron de 54,5 y 83,6, y los de AFP fueron de 75 y 76,4. En el área bajo las curvas ROC (ABC), la diferencia de sensibilidad y especificidad CSTB y AFP no era obvia (0,741:0,782, $P=0,429$). En este resultado, se mostró que el valor deseable de CSTB tenía una sensibilidad mayor y una especificidad menor que AFP. Para determinar la sensibilidad del valor de CSTB de acuerdo con el tamaño de la masa tumoral para diagnóstico temprano de carcinoma hepatocelular, la frecuencia de carcinoma hepatocelular que muestra un valor CSTB mayor que el valor deseable se comparó con el caso que muestra un valor de AFP mayor que el valor deseable (Tabla 3).

En el tejido con carcinoma hepatocelular con el tamaño de 3 cm o menor, el CSTB positivo mostró una sensibilidad de un 73,3 %, y en el tejido con carcinoma hepatocelular con el tamaño de 3 cm o más, el CSTB positivo mostró un 89,4 % de sensibilidad. Por el contrario, los valores de AFP mostraron una frecuencia de un 60 % y un 57,4 %, respectivamente. Se puede decir que el CSTB muestra una sensibilidad mayor en el diagnóstico de carcinoma hepatocelular o carcinoma hepatocelular progresivo que AFP.

Tabla 3

Tamaño del tumor (cm)	CSTB) 5,34 ng/ml	AFP) 32,6 ng/ml	P
(3	73,3 % (11/15)	60 % (9/15)	0.700
≥ 3	89,4 % (42/47)	57,4 % (27/47)	(0.001
Total	85,5 %(53/62)	58,1 % (36/62)	0.001

(Ejemplo 5) Preparación de gen recombinante de CSTB y establecimiento de línea celular que sobreexpresa el gen recombinante CSTB

Se adquirió la línea celular Hip 3B de hepatoma humano de ATCC (EE. UU.), y se cultivó a 37 °C bajo CO₂ a un 5 %. Se añadieron aminoácidos esenciales y piruvato al medio MEM que contenía FBS al 10 % para su uso. Se preparó el CSTB marcado con Myc usando un vector pCDNA3.1/Myc vector (Invitrogen, EE. UU.) para introducir en las células, y se introdujo un vector vacío (vector pCDNA3.1/Myc-HisA) en las células como control.

Se obtuvo el gen CSTB humano de 21C Frontier Human Gene Bank del Korea Research Institute of Bioscience y Biotechnology, y se amplificó el ADNc que codifica la proteína CSTB usando el gen como molde, un cebador directo (SEQ ID NO.: 1) con un sitio de restricción EcoRI, y un cebador inverso (SEQ ID NO.: 3) con un sitio de restricción XhoI por PCR, y después de digirió con una enzima de restricción, EcoRI y XhoI para realizar la electroforesis en un gel. A continuación, se cortó una banda, y se extrajo usando un kit de extracción génica (kit de purificación de gel Accursee; Pioneer, Daejeon, Korea) para su uso como inserto. Se digirió un vector pcDNA3.1/Myc-HisA con EcoRI y Sail para realizar la electroforesis en un gel de la misma manera. Se cortó una banda y se extrajo usando el kit de extracción génica (kit de purificación de gel Accursee; Pioneer, Daejeon, Korea) para su uso como vector.

Se insertó el inserto en el marco del vector usando un kit de ligación, se clonó y se introdujo en E. coli para amplificar. Por tanto, se purificó el plásmido preparado. Cuando se cultivaron las células Hip 3B de hepatoma hasta un 70 % del plato de 6 cm, se transfectó el gen usando una lipofectamina (Gibco, Invitrogen Co.). Después de 48 horas, se cultivaron las células en el medio selectivo que contenía G418 durante de 2 a 3 semanas. Se colocó cada colonia formada en una placa de 6 pocillos, y después de transfirió a un matraz T25 para observar su morfología. La línea celular de control a las 2 semanas y la línea celular que sobreexpresa CSTB a las 4 semanas se separaron y la

sobreexpresión de la proteína CSTB se confirmó por inmunotransferencia de CSTB (Fig. 9).

5 Después de que se introdujera el vector pCDNA3,1/Myc-HisA-CASTB, se observó sobre expresión de CSTB en CSTB 11,17,18,28, que se estableció. CSTB 11,17,18,28 se expresaron más que las líneas celulares de control VC2 y VC4 que expresaron el vector vacío (vector pCDNA3,1/Myc-HisA). Las líneas celulares presentes pueden ser un material para un estudio adicional del efecto de la expresión de la proteína de CSTB en la línea celular de carcinoma hepatocelular, y usarse en los estudios objetivo de biología molecular para el diagnóstico y tratamiento de carcinoma hepatocelular.

Aplicabilidad industrial

10 Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona un gen de cistatina B (CSTB) como marcador de diagnóstico para carcinoma hepatocelular, en el que la expresión del gen CSTB como marcador tumoral es rápida y sensiblemente cuantificada en el tejido del paciente, y la expresión de la proteína CSTB como producto del gen se detecta eficazmente en el fluido corporal, usándose de este modo en el diagnóstico temprano de carcinoma hepatocelular y en el diagnóstico de carcinomas hepatocelulares progresivos, invasivos y metastásicos.

15 <110> INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY

<120> Una composición de diagnóstico para carcinoma hepatocelular, un kit de diagnóstico que la comprende y procedimientos de diagnóstico de carcinoma hepatocelular

<130> PA9608-595/KR

<160> 4

20 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> un cebador directo 1 para RT-PCR

<400> 1

gtcgccgcca agatgatgtg c

21

30 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> un cebador directo 2 para RT-PCR

<400> 2

tgctattcaa gagccagggtg

20

<210> 3

40 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador inverso 1 para RT-PCR

<400> 3

5 gaaataggtc agctcatcat g

21

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador inverso 2 para RT-PCR

<400> 4

gctctggtag acggaggatg

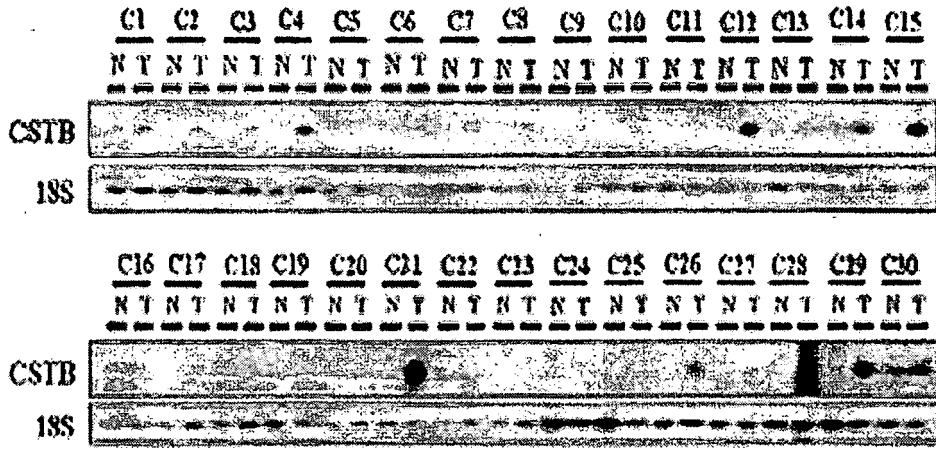
20

15

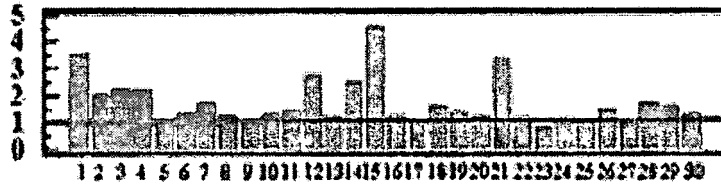
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar carcinoma hepatocelular que comprende las etapas de:
poner en contacto un material específico para un gen CSTB o una proteína CSTB con una muestra biológica y
comparar un nivel de expresión del gen CSTB o la proteína CSTB en la muestra biológica con el de una muestra
de control,
en el que el material específico para un gen CSTB es un cebador sentido y antisentido o una sonda
complementaria para el ARNm del gen CSTB y en el que el material específico para la proteína CSTB es un
anticuerpo específico para la proteína CSTB.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de poner en contacto el material específico
para el gen CSTB se realiza por una RT-PCR, una RT-PCR competitiva, una RT-PCR en tiempo real, un ensayo
de protección de RNasa, una transferencia northern o un chip de ADN.
3. Un procedimiento para determinar la progresión o pronóstico de carcinoma hepatocelular, usando el
procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Figura 1



Inducción en veces de ARNm de CSTB



Casos

Figura 2

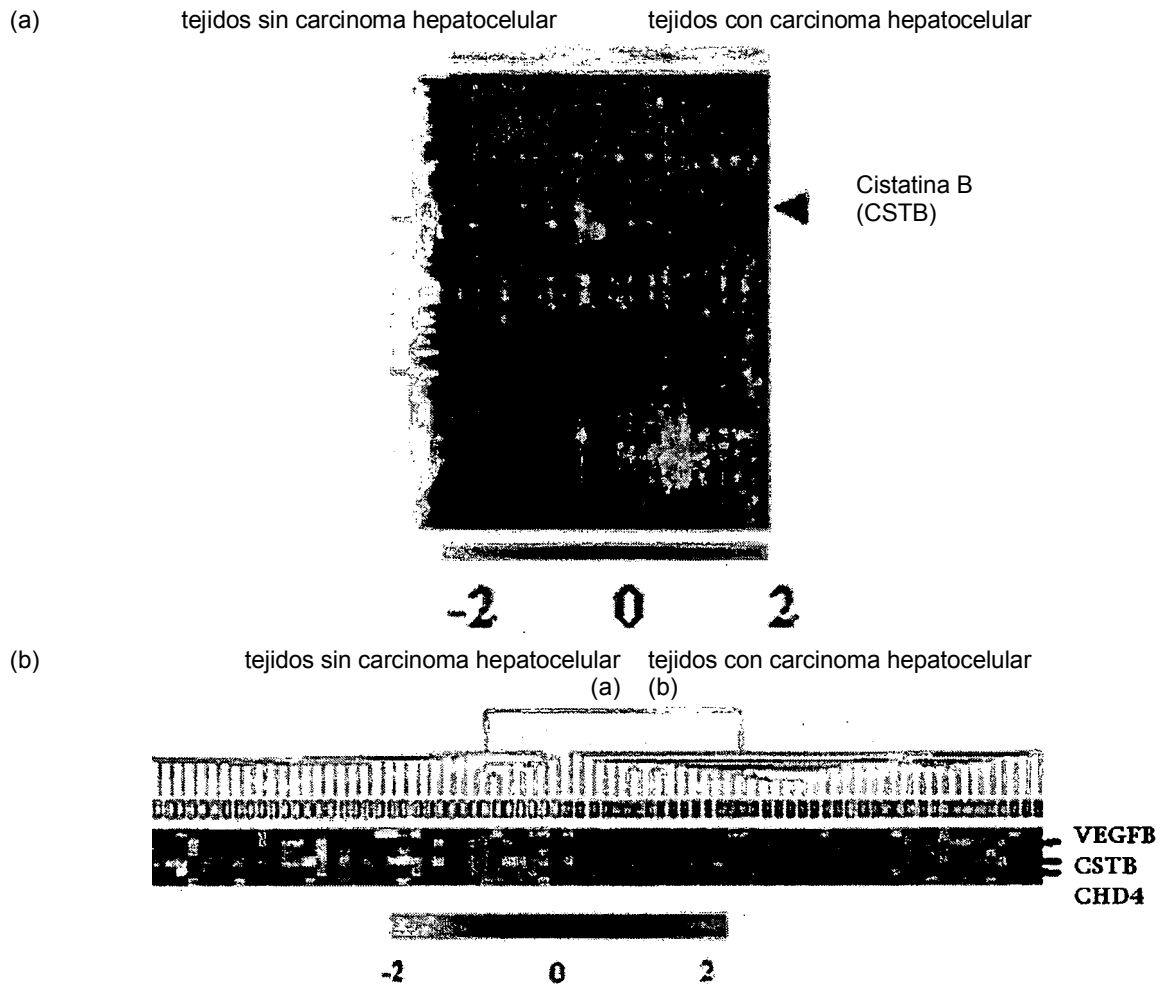


Figura 3

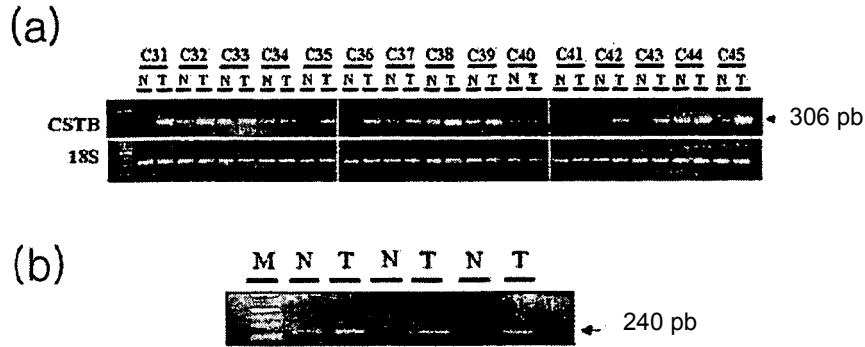


Figura 4

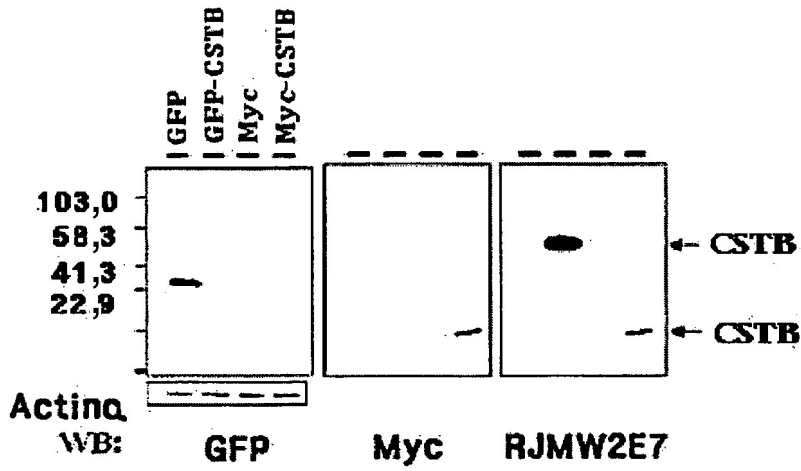


Figura 5

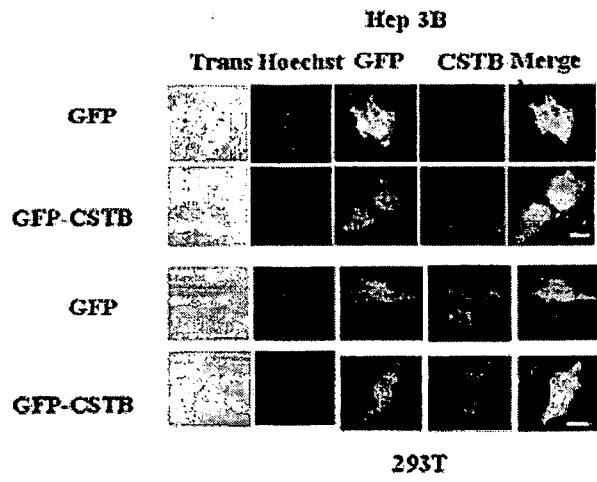


Figura 6

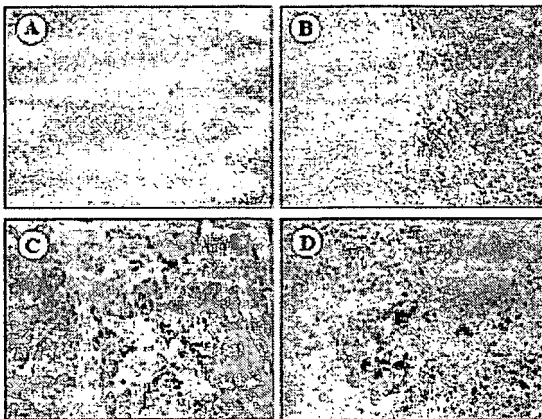


Figura 7

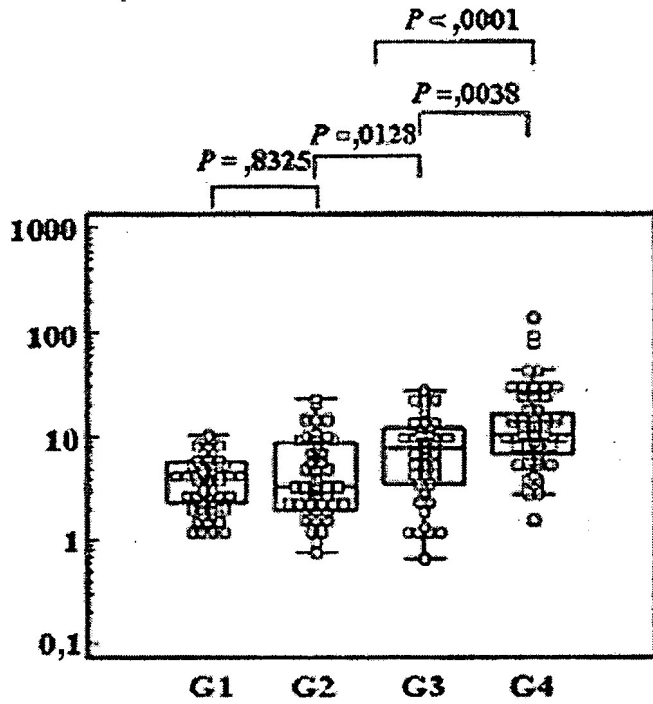
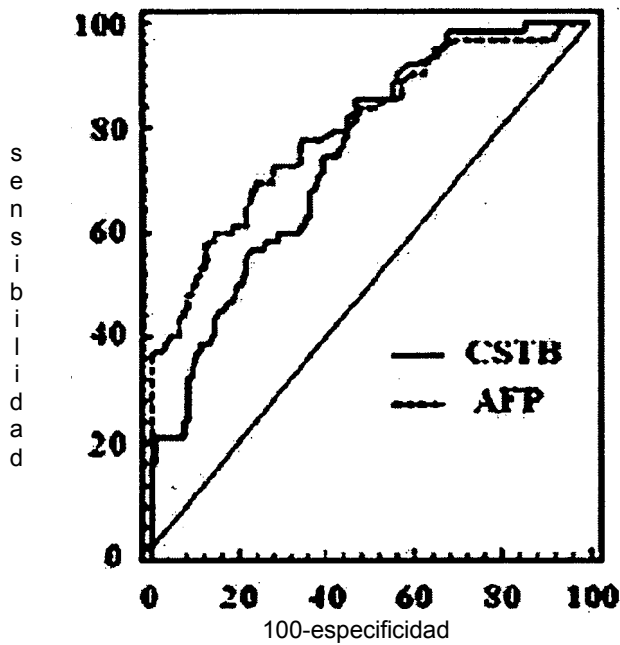


Figura 8



Curva ROC de CSTB
 El área por debajo de la curva ROC = 0,746
 Desviación estándar = 0,041
 Intervalo de confianza 95 % = 0,670~0,812

Curva ROC de AFP
 El área por debajo de la curva ROC = 0,795
 Desviación estándar = 0,038
 Intervalo de confianza 95 % = 0,742~0,855

Comparaciones de la curva ROC
 Diferencia del área por debajo de la curva ROC = 0,049
 Desviación estándar = 0,038
 Intervalo de confianza 95 % = 0,051~0,150
 Nivel de significancia $p = 0,337P$

Figura 9

