(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 576 743**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10764682 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2420575**

(54) Título: **Marcador para pronóstico de cáncer de hígado**

(30) Prioridad:

17.04.2009 KR 20090033638

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2016

(73) Titular/es:

CBS BIOSCIENCE, CO., LTD (50.0%)
59-5 Jang-dong Yuseong-ku
Daejeon 305-343, KR y
SHIM, YOUNGTACK (50.0%)

(72) Inventor/es:

PARK, JIN YOUNG;
HONG, SEOK JOO y
KIM, JONGMIN

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Marcador para pronóstico de cáncer de hígado

Campo Técnico

La presente descripción se relaciona con un marcador para pronóstico de cáncer de hígado, una composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende una sustancia para detectar el nivel de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado, un kit para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado, un método para estimar el pronóstico de cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, y un método para cribar un agente terapéutico para cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado.

Técnica Antecedente

El cáncer tiene el mismo significado que tumor maligno. Significa una afección donde la función de modular la proliferación celular está dañada debido a diversas razones y por lo tanto no se controlan las células anormales y proliferan en exceso para penetrar en los tejidos y órganos circundantes, formando masas y dañando los tejidos normales. El cáncer que se origina de diversos tejidos en el cuerpo humano pone la vida en peligro debido a su rápido crecimiento, crecimiento infiltrante (que se propaga o penetra), extensión (que se mueve lejos de su área original), etc.

Entre los cánceres, se conoce el cáncer de hígado como uno de los cánceres más mortales en el mundo. En particular, se reporta que por lo menos unas quinientas mil personas mueren de cáncer de hígado cada año en Asia y en África Subsahariana. El cáncer de hígado se puede clasificar en gran medida en carcinoma hepatocelular que surge de la célula hepática en sí misma y cáncer de hígado metastásico que es el cáncer de otros tejidos diseminados en el hígado. Alrededor de por lo menos 90% del cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular, y en general se entiende que el término cáncer de hígado se refiere a carcinoma hepatocelular.

Se reporta que la mayoría de las causas del cáncer de hígado son por una infección aguda o crónica por el virus de hepatitis B o el virus de hepatitis C. Sin embargo, no se ha aclarado todavía el mecanismo molecular dentro de las células en relación con la ocurrencia y el desarrollo de cáncer de hígado. De acuerdo con las investigaciones convencionales, se informa de que en el caso que se muten proto-oncogenes tales como varios genes de factores de crecimiento a oncogenes por diversas razones para ser sobreexpresados o sobre-activados, o en el caso de que se muten genes supresores de tumor tales como proteína Rb o proteína p53 por diversas razones para tener baja expresión o con pérdida de función, esto puede provocar la ocurrencia y progreso de diversos cánceres, que incluyen cáncer de hígado. En particular, con respecto al cáncer de hígado, se ha identificado que los genes, tales como p53 modificado, beta-catenina, AXINI, p21 (WAF1/CIP1) y p27 Kip, etc. están relacionados a los mismos. Sin embargo, recientemente, se reconoce que la ocurrencia y progreso de la mayoría de tipos de cáncer que incluyen cáncer de hígado no solo se debe a genes específicos, sino que se deben a la interacción compleja de diversos genes que se relacionan con el ciclo celular, entrega de señal, etc. Por lo tanto, sería necesario conseguir enfocarse solo en la expresión o función de los genes individuales o proteína y realizar investigaciones generales sobre diversos genes o proteínas.

El pronóstico de cáncer de hígado se refiere a la anticipación de diversas afecciones del paciente que sufre de cáncer de hígado, tales como posibilidad de una recuperación completa del cáncer de hígado, posibilidad de recurrencia después de tratamiento, posibilidad de supervivencia del paciente después de ser diagnosticado de cáncer de hígado, etc. Este puede variar dependiendo de diversas afecciones tales como gravedad de enfermedad, punto de diagnóstico, progreso de tratamiento, etc. El cáncer de hígado se puede tratar de manera eficiente sólo cuando diversos métodos de tratamiento se aplican adecuadamente de acuerdo con su pronóstico. Por ejemplo, con respecto a los pacientes que se estiman tienen buen pronóstico, sería necesario evitar los métodos de tratamiento peligrosos que tienen una posibilidad de provocar efectos secundarios graves en pacientes tales como tratamiento u operaciones químicas agresivas, métodos de tratamiento de radiación, y tratamiento de selección que son relativamente moderados, conservadores y seguros. Por otro lado, con respecto a los pacientes que se estima tiene mal pronóstico, el tratamiento u operaciones químicas, métodos de tratamiento, tales como tratamiento de radiación se deben llevar a cabo activamente en un intento de aumentar el período o tasa de supervivencia.

De acuerdo con las investigaciones conducidas hasta ahora, el pronóstico de cáncer de hígado que ya ha progresado es extremadamente malo, y muestra un alto índice fatal de muerte dentro de 6 meses desde el diagnóstico, que deja una duración promedio de vida de sólo 4 meses. Sin embargo, el cáncer de hígado que tiene un tamaño de menos de 3 cm tiene buen pronóstico, y se conoce que tiene una tasa de supervivencia del 90% para un año sin ningún tratamiento particular y después de cirugía, la tasa de supervivencia de cinco años es aproximadamente el 40 ~ 50%. Sin embargo, es muy difícil estimar el pronóstico de los pacientes con cáncer de hígado con precisión con la tecnología de la técnica anterior. Con el fin de estimar el pronóstico con precisión, se

requiere un método de análisis que clasifica a los pacientes en cada grupo de riesgo. Sin embargo, hasta ahora, se ha determinado que el pronóstico sólo depende de la etapa de cáncer de hígado patológica clínica en el momento del diagnóstico y el tratamiento quirúrgico primario sin un medio para estimar con precisión el pronóstico de cáncer de hígado. Sin embargo, por desgracia, el pronóstico de cada paciente de cáncer de hígado no se puede determinarse con precisión solo por la etapa de cáncer de hígado.

La proteína CBS (cistationina beta-sintasa) es una enzima que convierte la homocisteína acistationina, que se conoce por actuar en la ruta de transulfatación y cumple una función importante en el metabolismo de metionina in vivo [J Biol Chem. 1994 May 20;269(20):14835-40].

La proteína NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa) es una enzima que realiza N-metilación de nicotinamida y piridina, que se conoce que están involucradas en el metabolismo de diversos fármacos y compuestos xenobióticos [Genomics. 1998 Sep 15; 52 (3): 312-24].

La proteína TKT (transcetolasa) es una enzima que realiza la función central en la ruta de las pentosas fosfato no oxidativa, y como un miembro del grupo, TKTL1 (similar a transcetolasa 1), se conoce la TKTL2 (similar a transcetolasa 2) [J Biol Chem. 1993 Ene 15; 268 (2): 1397-404].

La proteína AIFM1 (factor inductor de apoptosis, asociado a mitocondria, 1) es una flavoproteína también conocida como AIF. Se conoce que si ocurre apoptosis, la proteína se mueve al núcleo, provocando aglomeración de cromosoma y fragmentación, e induce la secreción de citocromo c y caspasa-9 desde la mitocondria [Nature. 1999 Feb 4; 397 (6718): 441-6].

La proteína AKT es la proteína asociada a AKT2, AKT3, y se conoce que cumple una función en la entrega de señales del factor de crecimiento a través de fosfatidilinositol 3-quinasa, es decir, la entrega de señales del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina y factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), etc., y cuando se activa, se sabe que las proteínas relacionadas con apoptosis e inactiva las mismas [Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Jul;84(14):5034-7]

La proteína ATG3 (autofagia relacionada con el homólogo 3) está implicada en la unión entre el homólogo ATG8 humano tal como GATE-16, GABARAP, MAP-LC3 y el lípido. Se ha reportado que los ratones que carecen de ATG3 no forman autofagosoma, y mueren dentro de un día después del nacimiento [J Biol Chem. 2002 Abr 19; 277 (16): 13739-44. Epub 2002 1 FEB].

La proteína ATG5 (autofagia relacionada con el homólogo 5) está involucrada con la autofagia. Se conoce la ATG5 por formar un conjugado ATG12- ATG5 a través de la acción de ATG7 y ATG10, y este conjugado de ATG12-ATG5 se mueve a la membrana del autofagosoma para actuar en la unión de ATG8 y fosfatidiletanolamina. Se ha reportado que los ratones que carecen de ATG5 no forman autofagosoma y mueren inmediatamente después del nacimiento, y el corte de ATG5 pueden inducir la secreción de citocromo c y activar la caspasa en las mitocondrias [Nature 432: 1032-1036 (2004)].

La proteína ATG7 (autofagia relacionada con el homólogo 7) está involucrado con la autofagia. Se ha reportado que, junto con ATG10, la ATG7 forma el conjugado ATG12-ATG5, y junto con ATG3, está implicadas en la unión de ATG8 y fosfatidiletanolamina. Los ratones que carecen ATG7 no forman autofagosoma y mueren inmediatamente después del nacimiento [J Biol Chem. 2001 Jan 19;276(3):1701-6. Epub 2000 Nov 28].

La proteína ATG12 (autofagia relacionada con el homólogo 12) está involucrada con la autofagia. Se sabe que la ATG12 forma el conjugado ATG12-ATG5 a través de la acción de ATG7 y ATG10, y este conjugado ATG12-ATG5 se mueve a la membrana del autofagosoma para actuar en la unión de ATG8 y fosfatidiletanolamina [J Biol Chem. 1998 Dic 18; 273 (51): 33889-92].

La proteína BAX (proteína X asociada a BCL2) es una del grupo de proteína BCL2, y se conoce que promueve la apoptosis mediante la unión con BCL2, y está involucrada en la pérdida de membrana mitocondrial potencial y la secreción de citocromo c [Cell. 1993 Aug 27;74(4):609-19].

La proteína BCL2 (proteína de linfoma de células B 2) es una proteína de membrana de la mitocondria, que inhibe la apoptosis. Se conoce que inhibe la secreción de citocromo c de la mitocondria, activa la caspasa e inhibe la apoptosis mediante la unión con el factor de activación de apoptosis [Proc Natl Acad Sci USA. 1986 Jul;83(14):5214-8].

La proteína BCL2L1 proteína 1 similar a Bcl-2) es un miembro del grupo de proteínas BCL2, y se sabe que está colocada en la membrana externa de la mitocondria y está involucrada con el canal de membrana mitocondrial compartido. Está presente en dos tipos de isoformas. La forma más larga, BCL-XL, se conoce que inhibe la apoptosis, y la forma más corta, BCL-XS, se conoce que promueve la apoptosis [Cell. 1993 Aug 27;74(4):597-608].

La proteína BNIP3 (proteína 3 que interactúa con BCL2/adenovirus E1B 19kD) se puede unir con la proteína E1B 19 kDa y BCL2, y se conoce que induce apoptosis y autofagia [J Exp Med. 1997 Dic 15; 186 (12): 1975-1983].

La proteína CASP8 (caspasa 8, cisteína proteasa relacionada con apoptosis) es una enzima que cae dentro del grupo de la caspasa, que es una caspasa que actúa en la fase inicial del mecanismo de apoptosis mediante FAS. Si se activa a través de la unión con FADD y escisión proteolítica, activa varias otras caspasas [Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Dec 10;93(25):14486-91; Biochem J. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16]]

Se sabe que proteína CSE1L (segregación cromosómica CSE1 similar a 1) cumple una función en enviar de nuevo importin-α desde el núcleo hasta el citoplasma, y de estar involucrada en la apoptosis o la proliferación celular [Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Oct 24;92(22):10427-31].

La proteína DIABLO (proteína de unión a IAP directa con bajo pI) es una proteína colocada en la mitocondria, y si se produce apoptosis, se mueve al citoplasma para unirse con IAP (inhibidor de proteína de apoptosis) para ayudar a la activación de caspasa [Cell. 2000 Jul 7; 102 (1): 43-53].

La proteína DRAM (modulador de autofagia regulado por daño) es una proteína de membrana de lisosoma, y se conoce que está involucrada en la autofagia controlada por el supresor de tumores p53 y que es esencial en la apoptosis controlada por p53 [Cell. 2006 Jul 14; 126 (1): 121-34].

La proteína E2F (factor de transcripción 1 E2F) es un miembro de un factor de transcripción del grupo E2F, y se conoce que está estrechamente involucrada con el control del ciclo celular y supresor de tumores, y promueve el crecimiento celular mediante unión a la proteína Rb o induce apoptosis relacionada con p53 [Gene. 1996 Sep 16;173(2):163-9].

La proteína FAS (APO-1, CD95, TNFRSF6) es un miembro del grupo de receptores de TNF. Se conoce que recibe la señal de ligando FAS y compone el DISC (complejo de señalización que induce muerte) junto con FADD (proteína del dominio de muerte asociada a Fas), caspasa 8, y caspasa 10 para inducir la apoptosis [J Biol Chem. 1992 May 25;267(15):10709-15].

La proteína FRAP1 (objetivo mamífero de rapamicina) también se conoce como mTOR. Es conocida por mediar reacciones relacionadas con estrés, tales como daño del ADN dentro de las células, agotamiento de nutrición, etc., y se conoce que el material compuesto TORC2 que comprende FRAP1 es el objetivo de la detención del ciclo celular y la acción inmunosupresora del compuesto FKBP12-rapamicina [Nature. 1994 Jun 30; 369 (6483): 756-8].

La proteína LAMP1 (proteína 1 de membrana asociada lisosómica) también se conoce como antígeno CD107a. Es un tipo de glicoproteína de membrana, y parece estar involucrada con la propagación de las células de cáncer [J Biol Chem. 1990 May 5;265(13):7548-51].

La proteína LC3 (proteína 1 similar a cadena ligera 3 de MAP1) es la proteína asociada a microtúbulos y está involucrada en la interacción entre microtúbulos y el citoesqueleto. La proteína LC3 es un homólogo ATG8 de levadura, y se sabe que se une con fosfatidiletanolamina mediante la acción de varias proteínas de autofagia y componen elo autofagosoma [J Biol Chem. 1994 Apr 15;269(15):11492-7].

La proteína PRKAA1 (proteína quinasa activada con AMP, catalítica, alfa-1) es una subunidad catalítica de AMPK. Este AMPK es una proteína que cumple la función de detectar el nivel de energía dentro de las células. Se conoce que se activa cuando aumenta la relación de AMP/ATP y cumple una función en la limitación de diversas reacciones de biosíntesis [FEBS Lett. 1994 Dec 12;356(1):117-21].

La proteína PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina) es conocida por ser un supresor tumoral, y se inactiva en varios tipos de cánceres. Es a la vez, al mismo tiempo una fosfatasa de proteína y una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa, y se conoce a deteriorarse PI3K-AKT/PKB entrega de señal [Nat Genet. 1997 Apr; 15 (4): 356-62].

La proteína ULK1 (quinasa 1 similar a Unc-51) es una serina/treonina quinasa relacionada con el crecimiento axonal, y también conocida como homólogo ATG1. Con respecto a la autofagia, se conoce que se fosforila por mTOR [Genomics. 1998 Jul 1;51(1):76-85].

La proteína XIAP (inhibidor ligado a X de la proteína de apoptosis) es un miembro del grupo de IAP, y entre las IAP, tiene un fuerte efecto de inhibición de apoptosis. Se conoce que inhibe la apoptosis e inhibe la actividad de la caspasa través de unión con el factor asociado a receptor del factor de necrosis tumoral TRAF1, TRAF2 [Nature. 1996 Jan 25;379(6563):349-53].

Sin embargo, no se conoce cómo el nivel de expresión o patrón de expresión de las proteínas cambia en detalle en el tejido hepático, y cómo las proteínas se pueden utilizar para estimar el pronóstico de cáncer de hígado. Además,

hasta ahora, no hubo ningún ejemplo del uso de la proteína o genes que codifican la proteína como marcador para pronóstico de cáncer de hígado.

Descripción detallada del objeto técnico

Es un objeto de la presente descripción proporcionar un biomarcador que se relaciona con el pronóstico de cáncer de hígado para estimar el pronóstico de los pacientes con cáncer de hígado con facilidad y precisión, y adicionalmente proporcionar un punto de partida importante para el desarrollo de agentes terapéuticos para el cáncer de hígado. De acuerdo con lo anterior, la presente descripción proporciona un marcador para pronóstico de cáncer de hígado, una composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende una sustancia para detectar un cambio en el nivel de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado, un kit para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende la composición para estimar pronóstico de cáncer de hígado, un método para estimar el pronóstico de cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, y un método para cribar un agente terapéutico para cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado.

Medios para alcanzar el objeto

Los presentes inventores compararon el grado de la expresión de genes en tejidos de cáncer de hígado recolectados de una pluralidad de pacientes diagnosticados por tener cáncer de hígado, y se detectaron los genes expresados en una gran cantidad o una pequeña cantidad específicamente de acuerdo con el progreso de cada paciente para descubrir marcadores para el pronóstico de cáncer de hígado que se pueden utilizar para estimar el pronóstico de cáncer de hígado.

El primer aspecto de la presente descripción se relaciona con un marcador para pronóstico de cáncer de hígado que comprende una o una combinación de por lo menos dos seleccionados de un grupo que consiste de los siguientes genes:

CBS (cistationina beta-sintasa; NCBI GI: 209862802);

NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa; NCBI GI: 62953139);

TKT (transcetolasa; NCBI GI: 205277461);

AIFM1 (Factor que induce apoptosis 1, mitocondrial; NCBI GI: 22202627);

AKT1 (proteína quinasa RAC-alfa serina/treonina; NCBI GI: 62241010);

ATG3 (Proteína relacionada con autofagia 3; NCBI GI: 34147490);

ATG5 (Proteína de autofagia 5; NCBI GI: 92859692);

ATG7 (Proteína relacionada con autofagia 7; NCBI GI: 222144225);

ATG12 (Proteína relacionada con autofagia 12; NCBI GI: 38261968);

BAX (regulador de apoptosis BAX; NCBI GI: 34335114);

BCL2 (regulador de apoptosis Bcl-2; NCBI GI: 72198188);

BCL2L1 (regulador de apoptosis Bcl-X; NCBI GI: 20336333);

BNIP3 (proteína 3 que interactúa con proteína de BCL2/adenovirus E1B 19 kDa; NCBI GI: 7669480);

CASP8 (caspasa-8; NCBI GI: 122056470);

CSE1L (Exportina-2; NCBI GI: 29029558);

DIABLO (homólogo de Diablo, mitocondrial; NCBI GI: 218505810);

DRAM (Modulador de autofagia regulada por daño; NCBI GI: 110825977);

E2F1 (Factor de transcripción E2F1; NCBI GI: 168480109);

FAS (miembro de la superfamilia del receptor de factor de necrosis de tumor 6; NCBI GI: 23510419);

FRAP1 (proteína asociada al complejo de FKBP12-rapamicina; NCBI GI: 206725550);

LAMP1 (glicoproteína de membrana asociada a lisosoma 1; NCBI GI: 112380627);

LC3[MAP1LC3A] (proteínas asociadas a microtúbulos cadena de ligera 1A/1B 3A; NCBI GI: 31563519);

PRKAA1 (subunidad alfa-1 catalítica de quinasa proteína activada por 5'-AMP; NCBI GI: 94557300);

PTEN (Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa y proteína fosfatasa PTEN de especificidad doble; NCBI GI: 110224474);

ULK1 (quinasa proteína de Serina/treonina ULK1; NCBI GI: 225637564);

y XIAP (proteína 4 que contiene repeticiones de IAP baculovirales; NCBI GI: 32528298).

Se puede estimar el pronóstico de cáncer de hígado a partir de diversos aspectos. Sin embargo, de forma representativa, se determina desde el aspecto de la posibilidad de recurrencia, posibilidad de supervivencia, y posibilidad de supervivencia sin enfermedad. La investigación descrita en la presente especificación se procedió a obtener el perfil de expresión de gen del tejido de cáncer de hígado de una pluralidad de pacientes con cáncer de hígado, detectar los genes que presentan una diferencia significativa en el nivel de expresión pasando a través de procesamiento de datos estadísticos teniendo en cuenta los aspectos de posibilidad de recurrencia, posibilidad de supervivencia, posibilidad de supervivencia sin enfermedad todos juntos, y descubrir marcadores que permiten la estimación del pronóstico de cáncer de hígado.

En la presente especificación, "marcador para pronóstico de cáncer de hígado" se refiere a un marcador génico que es el criterio para estimar pacientes que tienen buen o mal pronóstico después de la aparición de cáncer de hígado. En la presente descripción, el nivel de expresión de este marcador dentro del tejido de cáncer de hígado de un paciente con buen pronóstico es distintivamente alto o bajo en comparación con el nivel estándar predeterminado experimentalmente. En particular, en la presente descripción, este marcador tiene un valor p significativamente bajo, cuyo valor se calcula con base en la diferencia de expresión sobre el tejido de cáncer de hígado de pacientes con buen pronóstico y mal pronóstico. Preferiblemente, el valor p es menor de 0.05.

La presente descripción hace un análisis al comparar el perfil de expresión génica del tejido de cáncer de hígado de pacientes con buen o mal progreso del tratamiento con el nivel estándar, con respecto a los tejidos de cáncer de hígado de una pluralidad de pacientes que se sabe tienen cáncer de hígado. Por lo tanto, el marcador confirmado como tal puede distinguir específicamente pacientes con buen o mal pronóstico de cáncer de hígado, y por lo tanto esto se puede utilizar de manera útil para estimar el pronóstico de cáncer de hígado. Además, teniendo en cuenta que el marcador confirmado como tal se expresa en una gran cantidad o una pequeña cantidad específicamente en el tejido de cáncer de hígado de pacientes con un pronóstico específico, la función fisiológica del marcador tiene la posibilidad de estar directamente relacionada con la función fisiológica que se relaciona con la aparición y el progreso de cáncer de hígado, en particular, el pronóstico de cáncer de hígado. Por lo tanto, este marcador se puede utilizar de manera útil como un objetivo en la investigación de la aparición y el progreso de cáncer de hígado o el desarrollo de un agente terapéutico contra el cáncer de hígado.

En particular, se descubrió que el marcador para pronóstico de cáncer de hígado en el primer aspecto de la presente descripción se basa en el análisis estadístico del tejido de cáncer de hígado de una pluralidad sin precedentes de pacientes. Por lo tanto, los marcadores tienen un significado mayor que los marcadores convencionales que se relacionan con el cáncer de hígado descubierto con base en el perfil de expresión génica de tejido de cáncer de hígado de sólo algunos pacientes, tienen un alto valor de utilidad clínica, y tienen más potencia de estimación precisa para estimar el pronóstico de cáncer de hígado.

El segundo aspecto de la presente descripción se relaciona con una composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende una sustancia para detectar específicamente el nivel de expresión, patrón de expresión, o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto.

Aquí, el patrón de nivel de expresión o la expresión de cada marcador para pronóstico de cáncer de hígado se puede detectar por métodos de análisis bioquímicos generales que confirman el nivel o patrón de mARN generado por la transcripción del gen correspondiente. Como tal un método de análisis para confirmar el nivel o patrón de mARN, existe RT-PCR, RT-PCR competitivo, RT-PCR en tiempo real, ensayo de protección RNasa, transferencia de

Northern, micromatrices de ADN, etc. Además, se puede utilizar cualquier método que se lleva a cabo generalmente en la técnica pertinente.

A través de los métodos de análisis anteriores, el nivel o patrón de mARN en la muestra biológica de un paciente con cáncer de hígado se puede comparar con el nivel estándar, y se detecta la diferencia en el nivel de expresión, patrón de expresión o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la presente descripción de los mismos. Esto permite estimar el pronóstico de los pacientes con cáncer de hígado. En la presente especificación, "muestra biológica" significa una célula, tejido, etc. separada del cuerpo humano en donde se puede detectar el nivel de expresión o patrón de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado, o el nivel existente o patrón existente de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado. Se puede ejemplificar por la orina, sangre, plasma, suero, etc., pero no se limita particularmente limitado a estos.

El kit para medir el nivel o patrón de mARN por RT-PCR comprende un cebador específico a mARN del marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la presente descripción. En la presente especificación, "cebador" significa una secuencia de ácido nucleico que tiene un grupo 3' hidroxilo libre que se puede unir complementariamente a una plantilla y que permite que la transcriptasa inversa o polimerasa ADN inicie la reproducción de la plantilla. El cebador es un nucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico de un gen específico, y se puede utilizar un cebador de una longitud de aproximadamente 7 pb ~ 50 pb, preferiblemente de aproximadamente 10 pb ~ 30 pb. Otros kits de RT-PCR pueden incluir un tubo de ensayo u otro recipiente adecuado, solución de regulador de reacción, desoxinucleótido (dNTPs), enzimas tales como Taq-polimerasa y transcriptasa inversa, DNAsa, ARNsa supresor, DEPC-agua, agua estéril, etc. de acuerdo con las realizaciones detalladas. El cebador puede iniciar la síntesis de ADN en presencia de un reactivo para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) y cuatro nucleósidos de trifosfato diferentes en una solución reguladora y temperatura adecuada. El cebador puede comprender otras secuencias de bases que no cambian la característica básica del cebador que actúa en el punto inicial de la síntesis de ADN. Se puede sintetizar el cebador químicamente utilizando métodos bien conocidos, y la secuencia de ácido nucleico se puede transformar utilizando muchos medios bien conocidos en la técnica pertinente.

La "sustancia para detectar específicamente el nivel de expresión, patrón de expresión, o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado" en el segundo aspecto de la presente descripción puede ser cualquier sustancia que se utilizar específicamente para un marcador correspondiente en un método para analizar el nivel de expresión o patrón de expresión del marcador correspondiente para pronóstico de cáncer de hígado, o una combinación de por lo menos dos de las sustancias, y que no se limita a un cebador para el uso de RT-PCR. La característica técnica del segundo aspecto de la presente descripción reside en comparar el nivel de expresión o patrón de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado en el tejido de cáncer de hígado de pacientes objeto con cáncer de hígado con el nivel estándar y detectar la diferencia. Por lo tanto, cualquier sustancia que puede detectar dicha diferencia se puede utilizar como una "sustancia para detectar específicamente el nivel de expresión, patrón de expresión, o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado" y lograr el efecto técnico objetivo de la presente invención. También, una persona que tenga experiencia común en la técnica puede seleccionar y utilizar una sustancia adecuada, se hace referencia al conocimiento común en la técnica pertinente de acuerdo con las realizaciones detalladas.

El tercer aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende una sustancia para detectar específicamente el nivel existente, patrón existente, o ambos de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto.

Con respecto al nivel de expresión o patrón de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la presente descripción, adicionalmente al método de detectar el nivel o patrón de mARN de acuerdo con la expresión de cada marcador como en el segundo aspecto de la presente descripción, también se puede utilizar el método para detección de un nivel existente o patrón existente de proteína codificada por cada marcador en la muestra para estimar un nivel de expresión o patrón de expresión de cada marcador.

La detección específica del nivel existente o patrón existente de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado en la presente descripción significa el proceso de confirmar cuánta proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado de existe la presente descripción existe en la muestra biológica y qué patrón que existe. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado se puede utilizar para el proceso de confirmar el nivel existente o patrón existente. En la presente especificación, "anticuerpo" significa una proteína que se puede unir específicamente al epítopo de un antígeno, y es un concepto que incluye anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal y anticuerpo recombinante.

Como un método para medir el nivel existente o patrón existente de proteína utilizando anticuerpo, existen transferencia de Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), radioinmunoensayo, radioinmunodifusión, inmunodifusión de Ouchterlony, inmunoelectroforesis en cohete, teñido de tejido inmunitario,

ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de fijación de complemento, FACS, chips de proteínas, etc. Sin embargo, además de lo anterior, se puede utilizar cualquier método comúnmente utilizado en la técnica pertinente.

A través de los métodos de análisis anteriores, se puede comparar el nivel de formación o patrón de formación del material compuesto de antígeno-anticuerpo en una muestra biológica de pacientes objeto con cáncer de hígado con el nivel estándar, y se puede determinar el nivel existente o patrón existente de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la presente descripción de los mismos, y finalmente, se puede estimar el pronóstico de pacientes con cáncer de hígado.

Aquí, "material compuesto de antígeno-anticuerpo" significa un compuesto de proteína codificada por un marcador para pronóstico de cáncer de hígado y un anticuerpo específico del mismo. El nivel de formación o patrón de formación de material compuesto de antígeno-anticuerpo en general, se puede medir mediante al detectar el tamaño y patrón de la señal del marcador de detección asociado con un anticuerpo secundario. Dicho marcador de detección se puede ejemplificar por la enzima, sustancia fluorescente, ligando, sustancia luminiscente, nanopartículas, moléculas redox, radioisótopos, etc., pero no se limita a los mismos. Cuando se utiliza la enzima como un marcador de detección, como enzimas que se pueden utilizar, existen ß-gluculonidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galacosidasa, ureasa, peroxidasa o fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa, hexoquinasa y GDPase, RNasa, glucosa oxidasa, luciferasa, fosfofructoquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, fosfenolpiruvato descarboxilasa, β-latamasa, etc., pero las enzimas no se limitan a estas. Cuando se utiliza una sustancia fluorescente como un marcador de detección, como sustancias fluorescentes que se pueden utilizar, existen fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, fluorescamina, etc., pero las sustancias fluorescentes no se limitan a estas. Cuando se utiliza un ligando como un marcador detección, como un ligando que se puede utilizar, existen derivados de biotina, etc., pero el ligando no se limita a estos. Cuando se utiliza una sustancia luminiscente como un marcador de detección, como sustancias luminiscentes que se pueden utilizar, existenéster de acridinio, luciferina, luciferasa, etc., pero las sustancias luminiscentes no se limitan a estas. Cuando se utilizan nanopartículas como marcador de detección, como nanopartículas que se pueden utilizar, existen oro coloidal, látex teñido, etc., pero las nanopartículas no se limitan a estas. Cuando se utilizan moléculas redox como marcador de detección, como moléculas redox que se pueden utilizar, existen ferroceno, complejos de rutenio, viológeno, quinona, ión de Ti, ión de Cs, diimida, 1,4-benzoquinona, hidroquinona, K4W (CN) 8, [Os(bpy)3]2+, [RU(bpy)3]2+, [MO(CN)8]4-, etc., pero las moléculas redox no se limitan a estas. Cuando se utiliza un radioisótopo como un marcador de detección, como radioisótopos que se pueden utilizar, existen 3H, 14C, 32P, 35S, 36C1, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 90Y, 1251, 131I o 186Re, etc., pero los radioisótopos no se limitan a estos.

En el tercer aspecto de la presente descripción, "una sustancia para detectar específicamente el nivel existente, patrón existente, o ambos de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado" puede ser cualquier sustancia que se puede utilizar específicamente para la proteína codificada por el marcador en un método de análisis para detectar el nivel existente o el patrón existente de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, pero no se limita necesariamente a anticuerpos. Las características técnicas del tercer aspecto de la presente descripción se comparan con el nivel existente o el patrón existente de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado en muestras biológicas de pacientes con cáncer de hígado con un valor de referencia y se detectan las diferencias. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier sustancia como "una sustancia para detectar específicamente el nivel existente, el patrón existente, o ambos de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado" y puede alcanzar efectos técnicos que la presente descripción tiene como objetivo lograr siempre y cuando la sustancia sea capaz de detectar dichas diferencias. Un experto en la técnica puede seleccionar/clasificar fácilmente una sustancia adecuada de acuerdo con realizaciones específicas basadas en el conocimiento promedio y tecnologías conocidas en la técnica.

El cuarto aspecto de la presente descripción se relaciona con un kit para estimar el pronóstico de cáncer de hígado, que comprende la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado del segundo o tercer aspecto de la presente descripción.

Adicionalmente a una sustancia para detectar específicamente el nivel de expresión, el patrón de expresión, o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado comprendido en la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado, o una sustancia para detectar específicamente el nivel existente , patrón existente, o ambos de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, el kit para estimar el pronóstico de cáncer de hígado de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más tipos de otros ingredientes, soluciones o aparatos, que son adecuados para métodos de análisis del nivel de expresión o patrón de expresión de gen o métodos de análisis del nivel existente o patrón existente de proteína. Por ejemplo, en el caso del kit de diagnóstico para detectar el nivel de expresión o el patrón de expresión del gen, el kit e diagnóstico puede comprender ingredientes esenciales necesarios para realizar RT-PCR, y además de los cebadores respectivos específicos para mARN de los genes marcadores, este kit de RT-PCR puede comprender, por ejemplo, tubo de ensayo u otro recipiente adecuado, solución reguladora de reacción, desoxinucleótido (dNTPs), enzimas tales como Taq-polimerasa y transcriptasa inversa, DNAsa, inhibidor de RNasa, DEPC-agua (DEPCwater), agua estéril , par de cebador específico a gen que se utiliza como un grupo de control cuantitativo, de acuerdo con realizaciones

específicas. Mientras tanto, en el caso de que el kit de diagnóstico sea para detectar el nivel existente o patrón existente de la proteína, el kit de diagnóstico puede comprender, por ejemplo, ingredientes esenciales necesarios para la realización de ELISA. Este kit de ELISA puede comprender ingredientes capaces de detectar anticuerpos unidos, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado, cromóforos, enzima (por ejemplo, enzima conectada a anticuerpo) y su sustrato, y un anticuerpo específico para la proteína del grupo de control cuantitativo. Adicionalmente, de acuerdo a los aspectos específicos, el kit de diagnóstico puede comprender de micromatrices de ADN o micromatrices de proteínas.

El quinto aspecto de la presente descripción se relaciona con un método para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende la etapa 1, tratar muestras biológicas recogidas de pacientes objeto de cáncer de hígado con la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado del segundo aspecto; y la etapa 2, detectar diferencias en el nivel de expresión, patrón de expresión, o ambos del marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la reivindicación 1 al comparar el resultado del tratamiento de la etapa 1 con un valor de referencia. Adicionalmente, el quinto aspecto de la presente descripción se relaciona con un método para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende la etapa 1, tratar muestras biológicas recogidas de pacientes con cáncer de hígado con la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado del tercer aspecto; y la etapa 2, detectar diferencias en el nivel existente, patrón existente, o ambos de la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado de la reivindicación 1 al comparar el resultado del tratamiento de la etapa 1 con un valor de referencia.

Por ejemplo, en el caso de la detección de la diferencia en el nivel de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado que se expresa mucho más en tejidos con cáncer de hígado de pacientes cuyo pronóstico de cáncer de hígado es bueno, si el nivel de expresión del marcador en muestras biológicas de los pacientes objeto de cáncer de hígado es más alto que un valor de referencia, se puede decir que esto sugiere que el pronóstico del cáncer de hígado es relativamente bueno. Mientras tanto, por ejemplo, en el caso de detectar la diferencia en el nivel de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado que se expresa mucho más en tejidos de cáncer de hígado de los pacientes objeto cuyo pronóstico de cáncer de hígado es pobre, si el nivel de expresión del marcador en muestras biológicas de los pacientes objeto con cáncer de hígado es más alto que un valor de referencia, se puede decir que esto sugiere que el pronóstico de cáncer de hígado es relativamente pobre.

Mientras tanto, por ejemplo, en el caso de detectar la diferencia en el nivel existente de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado que se expresa mucho más en tejidos de cáncer de hígado de los pacientes cuyo pronóstico de cáncer de hígado es bueno, si el actual nivel de proteína codificada por el marcador en muestras biológicas de los pacientes objeto de cáncer de hígado es más alto que un valor de referencia, se puede decir que esto sugiere que el pronóstico de cáncer de hígado es relativamente bueno. Mientras tanto, por ejemplo, en el caso de detectar la diferencia en el nivel existente de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado que se expresa mucho más en tejidos de cáncer de hígado de pacientes cuyo pronóstico de cáncer de hígado es pobre, si el nivel existente de proteína codificada por el marcador en muestras biológicas de pacientes objeto con cáncer de hígado es más alto que un valor de referencia, se puede decir que esto sugiere que el pronóstico de cáncer de hígado es relativamente pobre.

El sexto aspecto de la presente descripción se relaciona con un método para cribar un agente terapéutico para cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción.

A medida que el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción muestra diferencia notable en los patrones de expresión de acuerdo con el pronóstico de los pacientes con cáncer de hígado, se podría implicar directamente a los genes en las funciones fisiológicas relacionadas con la aparición o desarrollo de cáncer de hígado, en particular, el pronóstico. De acuerdo con lo anterior, la proteína codificada por el marcador se puede utilizar de manera útil como una proteína objetivo para estudiar el mecanismo de la aparición o desarrollo de cáncer de hígado o inventar un agente terapéutico para el cáncer de hígado. Es decir, el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción satisface un requisito previo importante para el desarrollo de un agente terapéutico contra el cáncer de hígado, y por lo tanto el método para cribar un agente terapéutico contra cáncer de hígado utilizando este marcador también se incluye en el alcance de la presente descripción.

Como un ejemplo del sexto aspecto de la presente descripción, existe un método para cribar agente terapéutico para el cáncer de hígado que comprende una etapa de comprobación de si un compuesto de ensayo promueve o inhibe la expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción.

Como el método para el cribar un agente terapéutico, por ejemplo, se pueden utilizar RT-PCR, RT-PCR competitivo, RT-PCR en tiempo real, ensayo de protección RNasa, transferencia Northern, micromatrices de ADN, SAGE [Análisis Serial de Expresión Génica; Velculescu y et al, Science 270: 484-7], MPSS [secuenciación de Firma Masivamente Paralela; Brenner et al, PNAS. USA. 97, 1665-1670], etc. Además de los métodos anteriores, si es necesario se pueden utilizar diversos métodos conocidos en la técnica.

Mientras tanto, como otro ejemplo del sexto aspecto de la presente descripción, existe un método para cribar un agente terapéutico para cáncer de hígado que comprende la etapa 1, unir un compuesto de ensayo a la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción; y etapa 2, comprobar si el compuesto de ensayo promueve o inhibe una actividad fisiológica de dicha proteína. Como el método para cribar un agente terapéutico, por ejemplo, se puede utilizar un método para fijar los marcadores proteínicos para el diagnóstico temprano de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción a una columna de afinidad y ponerlo en contacto con muestras para purificarlos [Pandya et al, Virus Res 87: 135-143, 2002], un método para utilizar sistema de dos híbridos, transferencia Western, un método de selección de alto rendimiento [Aviezer et al, J Biomol Screen 6: 171-7, 2001],. Además de los métodos anteriores, si es necesario se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica.

En el sexto aspecto de la presente descripción, como compuestos de prueba que se utilizarán para cribado, por ejemplo, se pueden utilizar extractos de tejidos, productos de expresión de genoteca, compuestos sintéticos, péptidos sintéticos, compuestos naturales, etc., pero los compuestos de prueba que se utilizarán para la detección no se limitan a estos.

El séptimo aspecto de la presente descripción se relaciona con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción.

El anticuerpo que reconoce específicamente el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción es una sustancia representante que detecta específicamente el nivel existente o el patrón existente de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, y de acuerdo con lo anterior se puede utilizar de forma útil para estimar el pronóstico de cáncer de hígado. Adicionalmente, dependiendo de los casos, el anticuerpo puede promover o inhibir específicamente la actividad de la proteína que cumple una función importante en la aparición o desarrollo de cáncer de hígado, y de acuerdo con lo anterior se puede utilizar como un agente terapéutico contra el cáncer de hígado.

Como se ha encontrado el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción, se puede llevar a cabo fácilmente la preparación de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y anticuerpos recombinantes para la proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado al utilizar tecnologías ampliamente conocidas en la técnica.

Se pueden preparar anticuerpos policlonales por métodos ampliamente conocidos en la técnica de inyectar antígeno de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción en animales y recolectar la sangre de los animales para obtener suero que comprende anticuerpos. Estos anticuerpos policlonales se pueden preparar de diversos anfitriones de especies de animales, tales como cabras, conejos, ovejas, monos, caballos, cerdos, ganado, perros, etc., y los métodos de preparación son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando un procedimiento de hibridoma [Kohler y Milstein (1976) European Jounral of Immunology 6:511-519] o tecnología de bibliotecas de anticuerpos de fagos [Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991], etc. que es ampliamente conocido en la técnica. Convencionalmente, un método de hibridoma utiliza células obtenidas de animales anfitriones que son inmunológicamente adecuados, tal como un ratón, a los que se les ha inyectado antígeno de proteína codificada por el marcador para pronóstico de cáncer de hígado del primer aspecto de la presente descripción, y una estirpe celular de cáncer o mieloma como la otra población. Los tejidos obtenidos de estas dos poblaciones se fusionan mediante un método ampliamente conocido en la técnica tal como polietilenglicol, y luego las células que producen anticuerpos se proliferan por un método de cultivo de tejidos estándar. Después de obtener una población de células homogéneas por subclonación de acuerdo con una técnica de dilución limitada, el hibridoma que puede producir anticuerpos deseados se cultiva en cantidad in vivo o in vitro de acuerdo con una técnica conocida. Un método de colección de anticuerpos de fagos es un método de producción de anticuerpos monoclonales al obtener un gen del anticuerpo deseado, que expresa el gen en la forma de la proteína de fusión sobre la superficie de fagos, y de ese modo producir una colección de anticuerpos in vitro, y separar los anticuerpos monoclonales deseados de la colección. Los anticuerpos monoclonales preparados por el método anterior se pueden separar utilizando métodos conocidos, tales como electroforesis en gel, diálisis, precipitación de sales, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.

El anticuerpo del séptimo aspecto de la presente descripción comprende fragmentos funcionales de una molécula de anticuerpo, además de formas perfectas de dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa. Los fragmentos funcionales de la molécula de anticuerpo se refieren a fragmentos que tienen funciones de unión a antígeno, e incluyen Fab, F(ab'), F(ab')2, Fv, etc.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente descripción, un marcador para pronóstico de cáncer de hígado, una composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende una sustancia para detectar cambios en el nivel de expresión del marcador para pronóstico de cáncer de hígado, un kit para estimar el pronóstico de cáncer de hígado que comprende la composición para estimar el pronóstico de cáncer de hígado, un método para estimar el pronóstico de cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado, y un método para cribar un agente terapéutico para cáncer de hígado utilizando el marcador para pronóstico de cáncer de hígado.

El marcador para pronóstico de cáncer de hígado se puede utilizar de forma útil para estimación de pronóstico correcta y sencilla de pacientes con cáncer de hígado. Adicionalmente, las funciones fisiológicas del marcador pueden estar directamente implicadas en la aparición o desarrollo de cáncer de hígado. De acuerdo con lo anterior, el marcador se puede utilizar de manera útil para estudiar el mecanismo de aparición o desarrollo de cáncer de hígado o como un objetivo para el desarrollo de un agente terapéutico para cáncer de hígado.

Los marcadores anteriores para pronóstico de cánceres de hígado son los que son más significativa y clínicamente útiles y capaces de predecir de forma más correcta la estimación para pronóstico de cáncer de hígado, ya que fueron descubiertos al analizar estadísticamente tejidos de cáncer de hígado obtenidos a partir de una abundancia de pacientes sin precedentes.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 a 10 son curvas de Kaplan-Meier ilustradas mediante la medición de los marcadores de pronóstico de cáncer de hígado de la presente descripción en aspectos de recurrencia, supervivencia general y supervivencia sin enfermedad.

Mejores realizaciones para llevar a cabo la invención

En adelante, la presente invención se explicará en detalle en los ejemplos 1 a 3; los otros ejemplos son ejemplos comparativos.

Los ejemplos solo se describen para ayudar a entender la presente invención, pero no para limitar el alcance de la presente invención de ninguna forma.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

Ejemplo 1: Extracción de ARN y síntesis de cADN

Se obtienen tejido de cáncer de hígado y tejido normal adyacente recolectado de 120 pacientes con cáncer de hígado cuya ocurrencia de cáncer de hígado se diagnosticó y se confirmó su desarrollo. El ARN de cada uno de los tejidos se extrajo y el cADN se sintetizó de acuerdo con los siguientes métodos.

El ARN total se extrajo de tejido de cáncer de hígado y tejido normal adyacente utilizando RNeasy Minikit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total del extracto de ARN obtenido se pesó utilizando Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.). Se realizó tratamiento con DNasa I en la etapa de extracción para eliminar el ADN genómico contaminado del extracto de ARN. La muestra que contiene 4 μg de ARN total se incubó con 2 μl de 1 cebador de oligo (dT) 18 μM (Genotech, Corea) en 70□ durante 7 minutos y se enfrió en hielo durante 5 minutos. Una mezcla de enzimas se preparó por separado [en un volumen total de 11 μl al agregar 2 μl de DTT 0.1 M (Duchefa, Países Bajos), 2 μl de regulador de transcripción inversa 10x, 5 μl de dNTP 2 mM, 1 μl de 200 U/μl de transcriptasa inversa MMLV, y 1 μl de 40 U/μl de inhibidor de RNasa (Enzynomics, Corea)]. Después de agregar la mezcla de enzimas a las muestras que contienen el ARN, se incubaron durante 90 minutos a 42° C, y luego se incubaron a 80° C durante 10 minutos para inactivar la transcriptasa inversa. Las muestras anteriores se llevaron hasta un volumen final de 400 μl al agregar dietilpirocarbonato (DEPC) tratado con agua.

Ejemplo 2: PCR en tiempo real cuantitativo

Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en tiempo real para cada una de las muestras de cADN obtenido del Ejemplo 1, utilizando PRISM 7900HT (Applied Biosystems, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en los siguientes dos marcadores genéticos:

CBS y

NNMT.

El análisis de PCR en tiempo real se realizó en un volumen total de 10 µl que incluyen 5 µl de mezcla maestra de expresión génica Taqman 2x (Applied Biosystems, EE.UU.), 1 µl de cada uno de los cebadores directo e inverso 5 µM, 1 µl de sonda 1 µM (Genotech, Corea), y 2 µl de cADN (en el caso de un grupo de control, la misma cantidad de agua). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo de una etapa de disociación a 95° C durante 10 minutos, seguido de una etapa de disociación a 95° C durante 15 segundos; y una etapa de síntesis a 60° C durante 1 minuto. Las secuencias de cebador y sonda se diseñaron utilizando Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.) y todas las secuencias de la sonda se marcaron con FAM en el extremo 5'y con TAMRA en el extremo 3'. Las siguientes secuencias de cebador y sonda en la Tabla 1 a continuación se utilizaron para cada uno de los marcadores:

Tabla 1

Marcador	**Secuencia (SEQ ID NO)**
CABS	
F	GTTGGCAAAGTCATCTACAAGCA (1)
R	GGGCGAAGTGGTCCATCTC (2)
P	ACGCTGGGCAGGCTCTCGCAC (3)
NNMT	
F	TTGAGGTGATCTCGCAAAGTTATT (4)
R	CTCGCCACCAGGGAGAAA (5)
NNMT	CCACCATGGCCAACAACGAAGGAC (6)
P	
F: cebador delantero	
R: cebador inverso	
P: sonda	

La expresión de cada uno de los genes marcadores se midió por triplicado, y luego se estandarizó al sustraer la expresión promedio de 5 tipos de genes de referencia (B2M, GAPDH, HMBS, HPRT1, y SDHA). El CT (el número de ciclos requeridos para alcanzar un umbral) de cada uno de los marcadores se midió y se calculó el valor ΔCT (CT de cada uno de los marcadores menos CT promedio de los genes de referencia). El número de copias de mARN se calculó como $2^{-\Delta PT}$. Las curvas de calibración se construyeron a partir de los resultados de amplificaciones simultáneas de diluciones en serie de las muestras de cADN.

Ejemplo 3: Análisis estadístico

En consideración de la expresión normalizada de cada uno de los marcadores obtenidos en el Ejemplo 2, y el progreso de los pacientes que han proporcionado los tejidos de cáncer de hígado, se completaron las curvas de Kaplan-Meier, y luego se realizó análisis de significación.

Con base en el progreso de 120 pacientes que han proporcionado tejidos de cáncer de hígado, para los respectivos casos de recurrencia, supervivencia general y supervivencia sin enfermedad, los pacientes fueron enumerados en el orden ascendente del período. Se calculó la tasa de supervivencia de intervalo (o tasa de recurrencia de intervalo) al dividir el número de supervivientes (o pacientes con recurrencia) por el número de pacientes expuestos a riesgo. La tasa de supervivencia acumulada (o tasa de recurrencia acumulada) es la probabilidad condicional, que se calculó al multiplicar la tasa de supervivencia acumulada anterior (o tasa de recurrencia acumulada) por la tasa de supervivencia actual de intervalo (o tasa de recurrencia de intervalo). Las curvas de Kaplan-Meier se construyeron como funciones en etapas con el eje horizontal del tiempo de supervivencia (o período de observación) y el eje vertical de la tasa de supervivencia acumulada (o tasa de recurrencia acumulada).

Para cada uno de los marcadores, se completaron las curvas de Kaplan-Meier con respecto a recurrencia, supervivencia general y supervivencia sin enfermedad. La expresión de cada uno de los marcadores que se midió en el Ejemplo 2 se clasificó en alta expresión y baja expresión con base en referencias estadísticamente significativas que se determinaron experimentalmente, y los casos de alta expresión y baja expresión para cada uno de los marcadores se separaron el uno del otro para completar las curvas de Kaplan-Meier. Las curvas de Kaplan-Meier terminadas se ilustran en la Figura 1.

Como se puede confirmar a partir de la Figura 1, en las curvas de Kaplan-Meier completadas con respecto a recurrencia, supervivencia general y supervivencia sin enfermedad, cada uno de los marcadores forma curvas donde los casos de alta expresión y baja expresión se distinguen claramente unos de otros. Esto significa que hay notables diferencias en la tasa de recurrencia de intervalo o la tasa de supervivencia de intervalo, y la tasa de recurrencia acumulada o tasa de supervivencia acumulada en base a estas entre los casos en los que cada uno de los marcadores muestra alta expresión y baja expresión, y que, por consiguiente, los patrones de expresión de cada de los marcadores puede ser un índice que muestra la posibilidad de recurrencia o la posibilidad de supervivencia de los pacientes.

Las pruebas de significación se realizaron mediante la prueba de rango logarítmico con respecto a cada uno de los marcadores y su combinación al calcular los valores de observación y valores esperados en cada punto de recurrencia o muerte para obtener estadísticas de prueba de Chi cuadrado. De esta manera, se calcularon los valores p y los valores p calculados son como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Marcador	Valor P		
	Recurrencia	**Supervivencia general**	**Supervivencia libre de enfermedad**
CBS	0.52879	0.00221	0.92216
NNMT	0.01694	0.05333	0.01649
CBS_NNMT	0.03441	0.03916	0.03641

Como se puede confirmar de la anterior Tabla 2, cada uno de los marcadores o su combinación muestra valores p suficientemente bajos para ser considerados significativos en términos de toda recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad. En particular, en el caso de la combinación de dos marcadores, todos los valores p para recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad fueron menores de 0.05, lo cual es deseable. Cuando un valor p se hace menor, la significación estadística se hace mayor. Por lo tanto, los valores de p bajos sugieren que la estimación para el pronóstico de cáncer de hígado por cada uno de los marcadores o su combinación es altamente precisa.

Ejemplo 4: Descubrimiento de un marcador adicional

A excepción de experimentación con tejido de cáncer de hígado y tejido normal adyacente obtenido de 185 pacientes de cáncer de hígado, se realizó un experimento de la misma manera que en los Ejemplos 1 a 3, y de este modo se obtuvieron las curvas Kaplan-Meier y valores p al utilizar el siguiente gen como un marcador:

TKT.

Los cebadores y la sonda usados son como se muestran en la siguiente Tabla 3; Las curvas de Kaplan-Meier se muestran en la Fig. 2; y los valores p calculados se muestran en la siguiente Tabla 4.

Tabla 3

Marcador	**Secuencia (SEQ ID NO)**
TKT	
F	GAGGCTGTGTCCAGTGCAGTAG (7)
R	CCACTTCTTGGTACCCGGTTAA (8)
P	CCTGGCATCACTGTCACCCACCTG (9)
F: cebador delantero	
R: cebador inverso	
P: sonda	

Tabla 4

Marcador	Valor P		
	Recurrencia	**Supervivencia general**	**Supervivencia libre de enfermedad**
TKT	0.03096	0.00099	0.00546

Como se puede ver en la Fig. 2, en las curvas de Kaplan-Meier completadas con respecto a recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad, el marcador anterior forma curvas donde los casos de alta expresión y baja expresión se distinguen claramente unos de otros. Esto significa que existen notables diferencias en la tasa de recurrencia de intervalo o tasa de supervivencia de intervalo o tasa de recurrencia acumulada o tasa de supervivencia acumulada en función de estos entre los casos en donde el marcador está en alta expresión y baja expresión, y que, en consecuencia, el patrón de expresión del marcador puede ser un índice que muestra la posibilidad de recurrencia o la posibilidad de supervivencia de los pacientes.

Como se puede confirmar de la Tabla 4 anterior, el marcador anterior muestra un valor de p menor de 0.05 con respecto a toda la recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad, que es deseablemente baja. Cuando un valor de p se hace menor, la significación estadística se hace mayor. Por lo tanto, el valor p bajo sugiere que la estimación del pronóstico de cáncer de hígado por el marcador es muy precisa.

Ejemplo 5: Descubrimiento de un marcador adicional

A excepción de la experimentación con tejido de cáncer de hígado y tejido normal adyacente obtenido a partir de 369 pacientes de cáncer de hígado, se realizó un experimento en la misma forma que en los Ejemplos 1 a 3, y de este modo se obtuvieron las curvas de Kaplan-Meier y los valores de p al utilizar los siguientes 23 genes como marcadores:

AIFM1

AKT1

ATG3

ATG5

ATG7

ATG12

BAX

BCL2

BCL2L1

BNIP3

CASP8

CSE1L

DIABLO

DRAM

E2F1

FAS

FRAP1

LAMP1

LC3[MAP1LC3A]

PRKAA1

PTEN

ULK1 y

XIAP

Los cebadores y sondas utilizados son como se muestra en la siguiente Tabla 5; Las curvas de Kaplan-Meier son como se muestra en las figuras 3 a 10; y los valores p calculados para cada uno de los marcadores se muestran en la siguiente Tabla 6. Los valores p calculados para combinaciones de cualquiera de los dos tipos de marcadores son como se muestran en las siguientes Tablas 7 a 9.

Tabla 5

Marcador	Secuencia (SEQ ID NO)	Marcador	Secuencia (SEQ ID NO]
BCL2		PRKAA1	
F	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA (10)	F	GGCAGTTGCCTACCATCTCATAA (46)
R	GCCGGTTGAGGTACTCAGTCA (11)	R	GCCGAGTCAGGTGATGATCA (47)
P	CCTGGTGGACAACATCGCCCTGT (12)	P	TCTATTTGGCGACAAGCCCACCTGATT (48)
FAS		ATG3	
F	AATGGTGTCAATGAASCCAAAAT (13)	F	CCATTGAAAATCACCCTCATCTG (49)
R	GTCATACGCTTCTTTCTTTCCATGA (14)		CACCTCAGCATGCCTGCAT (50)
P	TGACAATGTGCAAGACACAGCAGAACAGAA (15)	R P	CACCACCTCCCATGTGTTCAGTTCACC (51)
BAX		ATG12	
F	GGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG (16)	F	CGACAGCTTCGATTTGAATGAC (52)
R	CAGTTCCGCACCTTGGT (17)	R	GGAAGCGTCGCAAAGGA (53)
P	CAGCAAACTGGTGCTCAAGGOC CT (18)	P	TGTAATTGCGTGCCCGTACTCCGGC (54)
BCL2L1		ATG5	
F	GATTGCCTTTGTTTTGATGTTTGT (19)	F	TTTCCTCCACTGCCATCATTAA (55)
R	GGAAAGGiQAACCCAGGTTAGTG (20)	R	GGCCAAAGGTTTCAGCTTCA (66)
P	CAGAATTGATCATDTCCCCCCACTCTCC (21)	P	CCTCAGCTGTGACATGAAAGACTTACCGG (67)
AIFM1		ATG7	
F	TGAAGATCTCAATGAAGTAGCCAAACTAT (22)	F	CGGATGAATGAGCCTCCAA (58)
R	CTGCAGTGGGTTTGCCAAT (23)	R	GGACATTATCAAAGCGTGAAAGAA (59)
P	CAACATTCATGAAGACTGAAGCCCCACA (24)	P	TCTTGGGCTTGTGCCTGAGCAGATC (60)
CASP8		BNIP3	
F	CCTTCTGATTGATGGTGCTATTTTG (25)	F	TTCCCCCCAAGGAGTTCCT (61)

Marcador	Secuencia (SEQ ID NO)	Marcador	Secuencia (SEQ ID NO]
BCL2		PRKAA1	
R	GCGGTGAGCCGAGATCAC (26)	R	CGCTCGTGTTCCTCATGCT (62)
P	CAGAATCTCGCTCTGTCGCCCAGG (27)	P	ACCCGAAGCGCACGGCCAC (63)
CSE1L		DRAM	
F	GCATGATCCTGTAGGTCAAATGG (28)	F	CAGCCGCCTTCATTATGTCGTA (64)
R	CAGGCGGTAGACAACTTGTGAA (29)	R	TGGAGGTGTTGTTCCCGTATC (65)
P	AATAACCCCAAAATTCACCTGGCACAGTCA (30)	P	TGCTCTCCGGCCACSTCAACC (66)
XIAP F R	GACAGGCCATCTGAGACACATG (31) AGCATAGTCTGGCCAGTTCTGAA (32)	LAMP1 F R	TGCACTCAGATTTAAGCCTTACAAA (67) TCACCACGAGTGACCTTCATG (66)
P	AGACACCATATACCCGACGAACCCTGCC (33)	P	AAGCCTCTGGCCGTCACACGTAGG (69)
DIABLO		LC3	
F	AATCACATTCAGCTGGTGAAACTG (34)	F	AACCAGCACAGCATGGTGAGT (70)
R	TGCCAGCTTGGTTTCTGCTT (35)	R	CCTCGTCTTTCTCOTCCTCGTA (71)
P	AAGAGGTGCACCAGCTCTCCCGG (36)	P	TCCACGCCCATCGCGACA (72)
AKT1		ULK1	
F	TCTCGGGTGCATTTGAGAGAA (37)	F	TCGCGGCCGCATGT (73)
R	ACAGCACAAAAACGTCTTTCCA (38)	R	AAGGGTCCAGCACTATCAAGAGA (74)
P	CCACGCTGTCCTCTCGAGCGCA (39)	P	AGCAGGTCCTGCGCGCCTCAAC (75)
PTEN		E2F1	
F	TGGCGGAACTTGCAATCC (40)	F	CTGGACCACCTGATGAATATCTGT (76)
R	GCTGAGGGAACTCAAAGTACATGA (41)	R	CAATGCTACGAAGGTCCTGACA (77)
P	ATATTCCTCCAATTCAGGACCCACACGAC (42)	P	CAGCTGCGCCTGCTCTCGGA (78)
FRAP1			
F	AGGCCGCATTGTCTCTATCAA (43)	F: cebador delantero	
R	GCAGTAAATGCAGGTAGTCATGCA (44)	R: cebador inverso	
P	TGCAATCCAGCTGTTTGGCGCC (45)	P: sonda	

Tabla 6

Marcador	Valor P		
	Recurrencia	**Supervivencia general**	**Supervivencia libre de enfermedad**
BNIP3	0.02022	0.00354	0.00627
DRAM	0.00669	0.00512	0.00953
LAMP1	0.02721	0.00225	0.02398
LC3	0.01134	0.00003	0.02196
AIFM1	0.00117	0.04046	0.00114
AKT1	0.00042	0.00003	0.00093
BCL2	0.02467	0.00658	0.01477
BCL2L1	0.04975	0.01110	0.04464
FAS	0.00701	0.00000	0.00255
FRAP1	0.02911	0.00421	0.01940
BAX	0.02799	0.10527	0.03650
ULK1	0.05250	0.04146	0.04745
PTEN	0.09680	0.00893	0.07908
CSE1L	0.08817	0.00134	0.05249
XIAP	0.11658	0.03111	0.15221
ATG5	0.12114	0.00880	0.14045
E2F1	0.22181	0.04046	0.14706
DIABLO	0.19717	0.04542	0.24942
ATG3	0.28588	0.39987	0.17641
ATG7	0.06493	0.22432	0.06122
ATG12	0.19654	0.13755	0.26693
CASP8	0.10122	0.15557	0.18655
PRKAA1	0.18647	0.19015	0.32981

Tabla 7

Marcador	**Valor P**			**Marcador**	**Valor P**		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
ATG5_ATG7	0.15663	0.00589	0.19962	BNIP3_DRAM	0.02162	0.00173	0.10550
ATG5_BNIP3	0.04903	0.00536	0.04662	BNIP3_E2F1	0.09158	0.00221	0.02682
ATG5_DRAM	0.00308	0.02402	0.00859	BNIP3_LAMP1	0.03650	0.00947	0.01819
ATG5_E2F1	0.02165	0.00258	0.02076	BNIP3_LC3	0.00130	0.00004	0.00260
ATG5_LAMP1	0.01654	0.00270	0.02686	BNIP3_ULK1	0.10639	0.01120	0.06007
ATG5_LC3	0.00269	0.00001	0.00045	BNIP3_AIFM1	0.00084	0.00477	0.00111
ATG5_ULK1	0.08370	0.02165	0.02992	BNIP3_AKT1	0.00036	0.00001	0.00067

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
ATG5_AIFM1	0.00073	0.00539	0.00031	BNIP3_ATG3	0.02013	0.00371	0.00590
ATG5_AKT1	0.00013	0.00075	0.00025	BNIP3_ATG12	0.02547	0.00127	0.00207
ATG5_ATG3	0.16614	0.01176	0.14048	BNIP3_BAX	0.05882	0.00105	0.04363
ATG5_ATG12	0.14245	0.02291	0.17473	BNIP3_BCL2	0.00632	0.00002	0.00088
ATG5_BAX	0.06603	0.01020	0.07166	BNIP3_BCL2L1	0.04550	0.00009	0.00475
ATG5_BCL2	0.01846	0.00479	0.00904	BNIP3_CASP8	0.09283	0.00140	0.04177
ATG5_BCL2L1	0.01850	0.00474	0.01292	BNIP3_CSE1L	0.05584	0.00007	0.02126
ATG5_CASP8	0.09018	0.02486	0.15403	BMIP3_DIA6LO	0.14797	0.00343	0.06290
ATG5_CSE1L	0.20921	0.00061	0.11020	BNIP3_FAS	0.00484	0.00000	0.00171
ATG5_DIABLO	0.10373	0.00880	0.09206	BNIP3_FRAP1	0.01789	0.00342	0.00838
ATG5_FAS	0.00134	0.00000	0.00066	BNIP3_PRKAA1	0.10235	0.00096	0.00627
ATG5_FRAP1	0.01550	0.00835	0.01724	BNIP3_PTEN	0.01871	0.00504	0.00670
ATG5_PRKAA1	0.15990	0.02758	0.17648	BNIP3_XIAP	0.07272	0.00671	0.02349
ATG5_PTEN	0.10454	0.02060	0.12330	DRAM_E2F1	0.05933	0.02423	0.03906
ATG5_XIAP	0.07805	0.00032	0.07617	DRAM_LAMP1	0.00436	0.00232	0.01206
ATG7_BNIP3	0.03152	0.00141	0.00392	DRAM_LC3	0.00890	0.00003	0.02502
ATG7_DRAM	0.00669	0.01265	0.01042	DRAM_ULK1	0.02697	0.00201	0.02857
ATG7_E2F1	0.19080	0.05246	0.11006	DRAM_AIFM1	0.01153	0.02446	0.03577
ATG7_LAMP1	0.04615	0.00468	0.04289	DRAM_AKT1	0.00001	0.00000	0.00002
ATG7_LC3	0.01550	0.00017	0.04352	DRAM_ATG3	0.03660	0.04492	0.00895
ATG7_ULK1	0.02772	0.01613	0.01082	DRAM_ATG12	0.02283	0.00308	0.01500
ATG7_AIFM1	0.00031	0.05341	0.00075	DRAM_BAX	0.00026	0.00145	0.00259
ATG7_AKT1	0.00065	0.00003	0.00100	DRAM_BCL2	0.00427	0.00133	0.00233
ATG7_ATG3	0.25700	0.08356	0.30334	DRAM_BCL2L1	0.00017	0.00008	0.00157
ATG7_ATG12	0.10515	0.08168	0.26653	DRAM_CASP8	0.00455	0.00212	0.00859
ATG7_BAX	0.05367	0.03772	0.06089	DRAM_CSE1L	0.06106	0.01159	0.09206
ATG7_BCL2	0.02532	0.00107	0.01848	DRAM_DIABLO	0.03026	0.01389	0.04108
ATG7_BCL2L1	0.04597	0.01275	0.03730	DRAM_FAS	0.00065	0.00000	0.00040
ATG7_CASP8	0.28393	0.03978	0.12008	DRAM_FRAP1	0.00109	0.01182	0.00172

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
ATG7_CSE1L	0.08763	0.01256	0.04956	DRAM_PRKAA1	0.00917	0.01627	0.03695
ATG7_DIABLO	0.14685	0.26001	0.17462	DRAM_PTEN	0.00755	0.00455	0.02852
ATG7_FAS	0.00569	0.00000	0.00306	DRAM_XIAP	0.01616	0.00099	0.01646
ATG7_FRAP1	0.03716	0.17212	0.03870	E2F1_LAMP1	0.00316	0.00091	0.00459
ATG7_PRKAA1	0.22418	0.15039	0.06122	E2F1_LC3	0.01172	0.00012	0.03729
ATG7_PTEN	0.22594	0.00809	0.31309	E2F1_ULK1	0.03342	0.00245	0.02811
ATG7_XIAP	0.09661	0.04494	0.13129	E2F1_AIFM1	0.00133	0.00991	0.00212

Tabla 8

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
E2F1_AKT1	0.00031	0.00001	0.00035	LC3_FRAP1	0.00151	0.00002	0.00457
E2F1_ATG3	0.10870	0.04951	0.13822	LC3_PRKAA1	0.00463	0.00004	0.02196
E2F1_ATG12	0.16431	0.00762	0.05090	LC3_PTEN	0.00574	0.00006	0.00676
E2F1_BAX	0.02714	0.01489	0.03789	LC3_XIAP	0.00112	0.00000	0.00264
E2F1_BCL2	0.00716	0.00017	0.00361	ULK1_AIFM1	0.00004	0.00271	0.00000
E2F1_BCL2L1	0.03851	0.00511	0.01052	ULK1_AKT1	0.00009	0.00011	0.00017
E2F1_CASP8	0.07422	0.00993	0.09363	ULK1_ATG3	0.08868	0.02385	0.04993
E2F1_CSE1L	0.02619	0.02525	0.02747	ULK1_ATG12	0.03242	0.01312	0.02518
E2F1_DIABLO	0.14033	0.02897	0.29365	ULK1_BAX	0.10828	0.03532	0.07295
E2F1_FAS	0.00084	0.00000	0.00027	ULK1_BCL2	0.01626	0.00077	0.01425
E2F1_FRAP1	0.02063	0.00792	0.01632	ULK1_BCL2L1	0.00284	0.00186	0.00166
E2F1_PRKAA1	0.02286	0.03169	0.14706	ULK1_CASP8	0.04841	0.02399	0.03932
E2F1_PTEN	0.15150	0.01199	0.07354	ULK1_CSE1L	0.01897	0.01106	0.01575
E2F1_XIAP	0.05458	0.00110	0.02301	ULK1_DIABLO	0.03413	0.03998	0.04386
LAMP1_LC3	0.00212	0.00007	0.00381	ULK1_FAS	0.00271	0.00000	0.00185
LAMP1_ULK1	0.00594	0.01664	0.00165	ULK1_FRAP1	0.00118	0.04037	0.00059
LAMP1_AIFM1	0.00488	0.00132	0.00362	ULK1_PRKAA1	0.02697	0.02975	0.02504
LAMP1_AKT1	0.00078	0.00010	0.00176	ULK1_PTEN	0.06942	0.05032	0.04631
LAMP1_ATG3	0.00940	0.00019	0.00482	ULK1_XIAP	0.00151	0.00139	0.00037

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
LAMP1_ATG12	0.02021	0.00089	0.02300	AIFM1_AKT1	0.00002	0.00053	0.00002
LAMP1_BAX	0.01005	0.00146	0.00913	AIFM1_ATG3	0.00113	0.01802	0.00069
LAMP1_BCL2	0.01957	0.00454	0.01225	AIFM1_ATG12	0.00255	0.00589	0.00071
LAMP1_BCL2L1	0.00162	0.00109	0,00204	AIFM1_BAX	0.00088	0.00603	0.00112
LAMP1_CASP8	0.01155	0.00654	0.01492	AIFM1_BCL2	0.00951	0.00065	0.00520
LAMP1_CSE1L	0.00260	0.00167	0.00072	AIFM1_BCL2L1	0.00031	0.00046	0.00041
LAMP1_DIABLO	0.00904	0.00243	0.00405	AIFM1_CASP8	0.00097	0.00310	0.00179
LAMP1_FAS	0.00039	0.00000	0.00028	AIFM1_CSE1L	0.00475	0.01283	0.00686
LAMP1_FRAP1	0.01773	0.00289	0.01815	AIFM1_DIABLO	0.00186	0.04046	0.00307
LAMP1_PRKAA1	0.01790	0.00020	0.02398	AIFM1_FAS	0.01967	0.00000	0.01279
LAMP1_PTEN	0.02907	0.00122	0.01067	AIFM1_FRAP1	0.00010	0.03628	0.00013
LAMP1_XIAP	0.01038	0.00164	0.01272	AIFM1_PRKAA1	0.00090	0.02749	0.00114
LC3_ULK1	0.00136	0.00002	0.00296	AIFM1_PTEN	0.00101	0.00867	0.00123
LC3_AIFM1	0.00003	0.00015	0.00063	AIFM1_X1AP	0.00438	0.00388	0.00571
LC3_AKT1	0.00013	0.00001	0.00006	AKT1_ATG3	0.00037	0.00003	0.00043
LC3_ATG3	0.00560	0.00002	0.00871	AKT1_ATG12	0.00043	0.00037	0.00072
LC3_ATG12	0.00646	0.00003	0.01685	AKT1_BAX	0.00067	0.00074	0.00061
LC3_BAX	0.00250	0.00019	0.00638	AKT1_BCL2	0.00027	0.00001	0.00018
LC3_BCL2	0.00332	0.00078	0.00666	AKT1_BCL2L1	0.00310	0.00025	0.00265
LC3_BCL2L1	0.00485	0.00009	0.01206	AKT1_CASP8	0.00056	0.00005	0.00050
LC3_CASP8	0.02236	0.00005	0.04875	AKT1_CSE1L	0.00014	0.00000	0.00024
-LC3_CSEIL	0.03137	0.00017	0.04571	AKT1_DIABLO	0.00059	0.00004	0.00100
LC3_DIABLO	0.01354	0.00003	0.01930	AKT1_FAS	0.00016	0.00000	0.00012
LC3_FAS	0.00184	0.00000	0.00340	AKT1_FRAP1	0.00068	0.00005	0.00032

Tabla 9

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
AKT1_PRKAA1	0.00068	0.00001	0.00066	BCL2_PTEN	0.02127	0.00302	0.00809
AKT1_PTEN	0.00071	0.00018	0.00059	BCLS2_XIAP	0.02736	0,00290	0.01938
AKT1_XIAP	0.00116	0.00118	0.00100	BCL2L_CASP 8	0.08272	0.01882	0.05650
ATG3_A7G12	0.15445	0.14873	0.25699	BCL2L1_CSE 1L	0.01769	0.00000	0.00700
ATG3_BAX	0.02736	0.04408	0.02059	BCL2L1_DIAB LO	0.01088	0.01110	0.02757
ATG3_BCL2	0.01955	0.01158	0.01094	BCL2L1_FAS	0.00070	0.00000	0.00023
ATG3_BCL2L1	0.03868	0.01520	0.01342	BCL2L1_FRA P1	0.01802	0.01215	0.01427
ATG3_CASP8	0.18048	0.21489	0.10896	BCL2L1_PRK AA1	0.03436	0.00833	0.04360
ATG3_CSE1L	0.09776	0.01335	0.20272	BCL2L1_PTE N	0.04370	0.00257	0.01352
ATG3_DIABLO	0.18448	0.28800	0.06279	BCL2L1_XIAP	0.02829	0.02026	0.03847
ATG3_FAS	0.00701	0.00000	0.00048	CASP8_CSE1 L	0.12292	0.00721	0.05678
ATG3_FRAP1	0.03988	0.08529	0.04513	CASP8_DIAB LO	0.17491	0.18725	0.28080
ATG3_PRKAA1	0.12105	0.24500	0.14597	CASPB_FAS	0.00256	0.00000	0.00136
ATG3_PTEN	0.37245	0.01382	0.23336	CASP8_FRAP 1	0.05703	0.18479	0.03680
ATG3_XIAP	0.04243	0.06838	0.10574	CASP8_PRKA A1	0.12642	0.22765	0.18655
ATG12_BAX	0.03524	0_02723	0.03497	CASP8_PTEN	0.19020	0.23066	0.29905
ATG12_BCL2	0.01507	0.00202	0.01477	CASP8_XIAP	0.21861	0.01829	0.18520
ATG12-BCL2L1	0.03069	0.01334	0.03303	CSE1L_DIABL O	0.08685	0.00226	0.13233
ATG12_CASP8	0.03429	0.25396	0.24041	CSE1L_FAS	0.00106	0.00000	0.00045
ATG12_CSE1L	0.12720	0.00375	0.05225	CSE1L_FRAP 1	0.02406	0.00218	0.00208
ATG12_DIABLO	0.17794	0.13391	0.16379	CSE1L_PRKA A1	0.11173	0.01837	0.05249
ATG12_FAS	0.00629	0.00000	0.00255	CSE1L_PTEN	0.06721	0.00371	0.05229
ATG12_FRAP1	0.01939	0.06615	0.02144	CSE1L_XIAP	4.01878	0.00422	0.02168
ATG12_PRAA1	0.15988	0.07166	0.25753	DIABLO_FAS	0.00946	0.00000	0.00393
ATG12_PTEN	0.02937	0.07228	0.29766	DIABLO_FRA P1	0.00193	0.00706	0.00190
ATG12_XIAP	0.1451	0.10198	0.15802	DIABLO_PRK AA1	0.39049	0.22100	0.21006

Marcador	Valor P			Marcador	Valor P		
	Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad		Recurrencia	Supervivencia general	Supervivencia libre de enfermedad
BAX_BCL2	0.01443	0.00904	0.01411	DIABLO_PTEN	0.18426	0.00785	0.14222
BAX_BCL2L1	0.14757	0.01104	0.48992	DIABLO_XIAP	0,21769	0.03111	0.25563
BAX_CASP8	0.1873	0.34789	0.19927	PAS_FRAP1	0.00603	0.00000	0.00103
BAX_CSE1L	0.00618	0.00328	0.00814	FAS_PRKAA1	0.00750	0.00000	0.00181
BAX_DIABLO	0.07894	0.10527	0.06564	FAS_PTEN	0.00701	0.00000	0.00420
BAX_FAS	0.00177	0.00000	0.00025	FAS_XIAP	0.00366	0.00000	0.00154
BAX_FRAP1	0.01460	0.17898	0.01397	FRAP1_RKAA1	0.02661	0.19329	0.01940
BAX_PRKAA1	0.05687	0.11741	0.03650	FRAP1_PTEN	0.02321	0.05015	0.01473
BAX_PTEN	0.02200	0.12485	0.04668	FRAP1_XIAP	0.03353	0.03111	0.01147
BAX_XIAP	0.06035	0.02569	0.02866	PRKAA1_PTEN	0.17904	0.00186	0.07802
BCL2_BCL2L1L1	0.01560	0.00096	0.01055	PRKAA1_XIAP	0.18116	0.02727	0.15221
BCL2_CASP8	0.03785	0.00703	0.01883	PTEN_XIAP	0.03963	0.01364	0.17000
BCL2_CSE1L	0.00982	0.00417	0.00709				
BCL2_DIABLO	0.02945	0.00215	0.00896				
BCL2_FAS	0.00235	0.00000	0.00069				
BCL2_FRAP1	0.02771	0.00437	0.01162				
BCL2_PRKAA1	0.00963	4.00180	0.01691				

Como se puede confirmar en las figuras. 3 a 10, en las curvas de Kaplan-Meier completadas con respecto a la recurrencia, supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, cada uno de los marcadores de forma curvas donde los casos de alta expresión y baja expresión se distinguen claramente unos de otros. Esto significa que existen diferencias notables en la tasa de repetición de intervalo o la tasa de supervivencia de intervalo, y la tasa de recurrencia acumulada o tasa de supervivencia acumulada en función de estos entre los casos en los que cada uno de los marcadores muestra alta expresión y baja expresión, y que, por consiguiente, los patrones de expresión de cada de los marcadores puede ser un índice que muestra la posibilidad de recurrencia o la posibilidad de supervivencia de los pacientes.

Como se puede confirmar a partir de las Tablas 6 a 9 anteriores, cada uno de los marcadores o todas las combinaciones de dos tipos de marcadores muestran valores p lo suficientemente bajos como para ser considerados significativos en términos de toda recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad. Cuando un valor p se hace menor, la significancia estadística se hace mayor. Por lo tanto, los valores p bajos sugieren que la estimación para el pronóstico de cáncer de hígado por cada uno de los marcadores o sus combinaciones son exactos. En particular, la mayoría de cada uno de los marcadores o cualquier combinación de dos tipos de marcadores muestran los valores p de menos de 0.05, que es deseablemente baja.

Todos los valores de p de combinaciones de tres o más tipos de marcadores son menores de 0.05, marcadores individuales o combinaciones de dos o más marcadores que muestran valores p más bajos, y los correspondientes valores de p son como se muestra a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10

[Recurrencia]		
Número de marcadores combinados	Marcador	Valor P
1	AKT1	0.00300
2	DRAM_AKT1	0.00041
3	DRAM_ULK1_AKT1	0.00010
4	DRAM_ULK1_AKT1_CSE1L	0.00004
5	DRAM_ULK1_KT1_ATG12_CSE1L	0.00002
6	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_CSE1L_FRAP1	0.00002
7	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_ATG12_CSE1L_FRAP1	0.00001
8	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_ATG3-ATG12_CSE1_FRAP1	0,00001
[Supervivencia General]		
Número de marcadores combinados	Marcador	Valor P
1	FAS	0.00000
2	DRAM_FAS	0.00000
3	DRAM_ATG3_FAS	0.00000
4	DRAM_AKT1_CSE1L_FAS	0.00000
5	DRAM_AKT1_ATG3_CSE1L_FAS	0.00000
6	ATG7_DRAM_AKT1_ATG3_CSE1L_FAS	0.00000
7	ATG7_DRAM_AKT1_ATG3_DIABLO_FAS_PRKAA1	0.00000
8	ATG7_DRAM_AKT1_ATG3_CSE1L_FAS_PRKAA1_XIAP	0.00000
[Supervivencia libre de enfermedad]		
Número de marcadores combinados	Marcador	Valor P
1	AKT1	0.00220
2	DRAM_AKT1	0.00049
3	DRAM_ULK1_AKT1	0.00010
4	DRAH_ULK1_AKT1_CSE1L	0.00003
5	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_CSE1L	0.00002
6	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_ATG12_CSE1L	0.00002
7	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_CSE1L_FRAP1_PRKAA1	0.00001

[Recurrencia]		
Número de marcadores combinados	Marcador	Valor P
8	DRAM_E2F1_ULK1_AKT1_ATG12_CSE1L_FRAP1_PRKAA1	0.00001

Como se puede ver de la Tabla 10 anterior, se puede encontrar que, entre más marcadores de la presente invención se combinen, más bajos son los valores p. Esto significa que entre más marcadores de la presente descripción se combinen, menores valores p, lo que significa mayor importancia, se muestra, lo que significaría que se alcance precisión mejorada en la estimación para el pronóstico basado en las combinaciones de los marcadores.

Ejemplo 6: Validación cruzada

Se realizó validación cruzada para combinaciones de marcadores que fueron estadísticamente significativas en el Ejemplo 5.

369 pacientes de cáncer de hígado se dividieron al azar en dos grupos (grupo positivo: 185 pacientes; grupo de prueba: 184 pacientes). Para el grupo positivo, se estableció experimentalmente un valor inicial que fue considerado estadísticamente significativo de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 3, y se hizo una clasificación en alta expresión y baja expresión. Con el valor inicial establecido fijado de este modo, para el grupo de prueba, la exactitud de la estimación se calculó que estaba en el nivel de $p < 0.05$ o $p < 0.001$ con respecto a la recurrencia, la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.

Entre los ejemplos representativos que muestran la excelente precisión de pronóstico con respecto a la recurrencia, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad son las siguientes:

Recurrencia: AIFM1_AKT1_LC3 (77.3% en el nivel de $p<0.05$)

Supervivencia general: ATG5_DRAM_FAS_XIAP (87.3% en el nivel de $p<0.001$)

Supervivencia libre de enfermedad: AIFM1_AKT1_LC3 (71.3% en el nivel de $p<0.05$)

<110> CBSBIOSCIENCE, CO., LTD

<120> MARCADORES PARA PRONÓSTICO DE CÁNCER DE HÍGADO

<130> Y09KP-027

<160> 78

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero CBS

<400> 1

gttggcaaag tcatctacaa gca 23

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso CBS

<400> 2

gggcgaagtg gtccatctc 19

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda CBS

<400> 3

acgctgggca ggctctcgca c 21

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero NNMT

<400> 4

ttgaggtgat ctcgcaaagt tatt 24

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso NNMT

<400> 5

ctcgccacca gggagaaa 18

<210> 6

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda NNMT

<400> 6

ccaccatggc caacaacgaa ggac 24

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero TKT

<400> 7

gaggctgtgt ccagtgcagt ag 22

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso TKT

<400> 8

ccacttcttg gtacccggtt aa 22

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda TKT

<400> 9

cctggcatca ctgtcaccca cctg 24

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero BCL2

<400> 10

catgtgtgtg gagagcgtca a 21

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso BCL2

<400> 11

gccggttcag gtactcagtc a 21

<210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda BCL2

<400> 12

cctggtggac aacatcgccc tgt 23

<210> 13

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero FAS

<400> 13

aatggtgtca atgaagccaa aat 23

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso FAS

<400> 14

gtcatacgct tctttctttc catga 25

<210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda FAS

<400> 15

tgacaatgtc caagacacag cagaacagaa 30

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero BAX

<400> 16

ggttgtcgcc cttttctact ttg 23

<210> 17

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso BAX

<400> 17

cagttccggc accttggt 18

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda BAX

<400> 18

cagcaaactg gtgctcaagg ccct 24

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero BCL2L1

<400> 19

gattgccttt gttttgatgt ttgt 24

<210> 20

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso BCL2L1

<400> 20

ggaaagggaa cccaggttag tg 22

<210> 21

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda BCL2L1

<400> 21

cagaattgat cattttcccc ccactctcc 29

<210> 22

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero AIFM1

<400> 22

tgaagatctc aatgaagtag ccaaactat 29

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso AIFM1

<400> 23

ctgcagtggg tttgccaat 19

<210> 24

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda AIFM1

<400> 24

caacattcat gaagactgaa gccccaca 28

<210> 25

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero CASP8

<400> 25

ccttctgatt gatggtgcta ttttg 25

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso CASP8

<400> 26

gcggtgagcc gagatcac 18

<210> 27

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda CASP8

<400> 27

cagaatctcg ctctgtcgcc cagg 24

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero CSE1L

<400> 28

gcatgatcct gtaggtcaaa tgg 23

<210> 29

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso CSE1L

<400> 29

caggcggtag acaacttgtg aa 22

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda CSE1L

<400> 30

aataacccca aaattcacct ggcacagtca 30

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero XIAP

<400> 31

gacaggccat ctgagacaca tg 22

<210> 32

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso XIAP

<400> 32

agcatagtct ggccagttct gaa 23

<210> 33

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda XIAP

<400> 33

agacaccata tacccgagga accctgcc 28

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero DIABLO

<400> 34

aatcacattc agctggtgaa actg 24

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso DIABLO

<400> 35

tgccagcttg gtttctgctt 20

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda DIABLO

<400> 36

aagaggtgca ccagctctcc egg 23

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero AKT1

<400> 37

tctcgggtgc atttgagaga a 21

<210> 38

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso AKT1

<400> 38

acagcacaaa aacgtctttc ca 22

<210> 39

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda AKT1

<400> 39

ccacgctgtc ctctcgagcc ca 22

<210> 40

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero PTEN

<400> 40

tggcggaact tgcaatcc 18

<210> 41

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso PTEN

<400> 41

gctgagggaa ctcaaagtac atga 24

<210> 42

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda PTEN

<400> 42

atattcctcc aattcaggac ccacacgac 29

<210> 43

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero FRAP1

<400> 43

aggccgcatt gtctctatca a 21

<210> 44

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso FRAP1

<400> 44

gcagtaaatg caggtagtca tcca 24

<210> 45

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sonda FRAP1

<400> 45

tgcaatccag ctgtttggcg cc 22

<210> 46

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero PRKAA1

<400> 46

ggcagttgcc taccatctca taa 23

<210> 47

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso PRKAA1

<400> 47

gccgagtcag gtgatgatca 20

<210> 48

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda PRKAA1

<400> 48

tctatttggc gacaagccca cctgatt 27

<210> 49

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero ATG3

<400> 49

ccattgaaaa tcaccctcat ctg 23

<210> 50

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ATG3

<400> 50

cacctcagca tgcctgcat 19

<210> 51

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ATG3

<400> 51

caccacctcc catgtgttca gttcacc 27

<210> 52

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero ATG12

<400> 52

cgacagcttc gatttgaatg ac 22

<210> 53

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ATG12

<400> 53

gggagcgtcg caaagga 17

<210> 54

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ATG12

<400> 54

tgtaattgcg tccccctact ccggc 25

<210> 55

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero ATG5

<400> 55

tttcctccac tgccatcatt aa 22

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ATG5

<400> 56

ggccaaaggt ttcagcttca 20

<210> 57

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ATG5

<400> 57

cctcagctgt gacatgaaag acttaccgg 29

<210> 58

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero ATG7

<400> 58

cggatgaatg agcctccaa 19

<210> 59

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ATG7

<400> 59

ggacattatc aaaccgtgaa agaa 24

<210> 60

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ATG7

<400> 60

tcttgggctt gtgcctcacc agatc 25

<210> 61

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero BNIP3

<400> 61

ttccccccaa ggagttcct 19

<210> 62

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso BNIP3

<400> 62

cgctcgtgtt cctcatgct 19

<210> 63

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda BNIP3

<400> 63

acccgaagcg cacggccac 19

<210> 64

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero DRAM

<400> 64

cagccgcctt cattatctcc ta 22

<210> 65

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso DRAM

<400> 65

tggaggtgtt gttcccgtat c 21

<210> 66

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda DRAM

<400> 66

tgctctccgg gcacgtcaac c 21

<210> 67

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero LAMP1

<400> 67

tgcactcaga tttaagcctt acaaa 25

<210> 68

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso LAMP1

<400> 68

tcaccacgag tgaccttcat g 21

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda LAMP1

<400> 69

aagcctctgg ccgtcacacg tagg 24

<210> 70

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero LC3

<400> 70

aaccagcaca gcatggtgag t 21

<210> 71

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso LC3

<400> 71

cctcgtcttt ctcctgctcg ta 22

<210> 72

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda LC3

<400> 72

tccacgccca tcgcggaca 19

<210> 73

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero ULK1

<400> 73

tcgcggccgc atgt 14

<210> 74

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso ULK1

<400> 74

aagggtccag cactatcaag aga 23

<210> 75

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda ULK1

<400> 75

agcaggtcct gggcgcctca ac 22

<210> 76

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador delantero E2F1

<400> 76

ctggaccacc tgatgaatat ctgt 24

<210> 77

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso E2F1

<400> 77

caatgctacg aaggtcctga ca 22

<210> 78

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sonda E2F1

<400> 78

cagctgcgcc tgctctccga 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para estimar el pronóstico de supervivencia general en un paciente con cáncer de hígado que comprende:

etapa 1, poner en contacto una muestra biológica recolectada del paciente que tiene cáncer de hígado con una composición que comprende una sustancia para detectar específicamente el nivel de expresión del gen CBS;

etapa 2, detectar diferencias en el nivel de expresión de CBS al comparar el resultado del tratamiento de la etapa 1 con un valor de referencia;

en donde se pronostica la supervivencia general del cáncer de hígado, y en donde el nivel de expresión de CBS mayor que el valor de referencia indica que el pronóstico de supervivencia general es relativamente bueno.

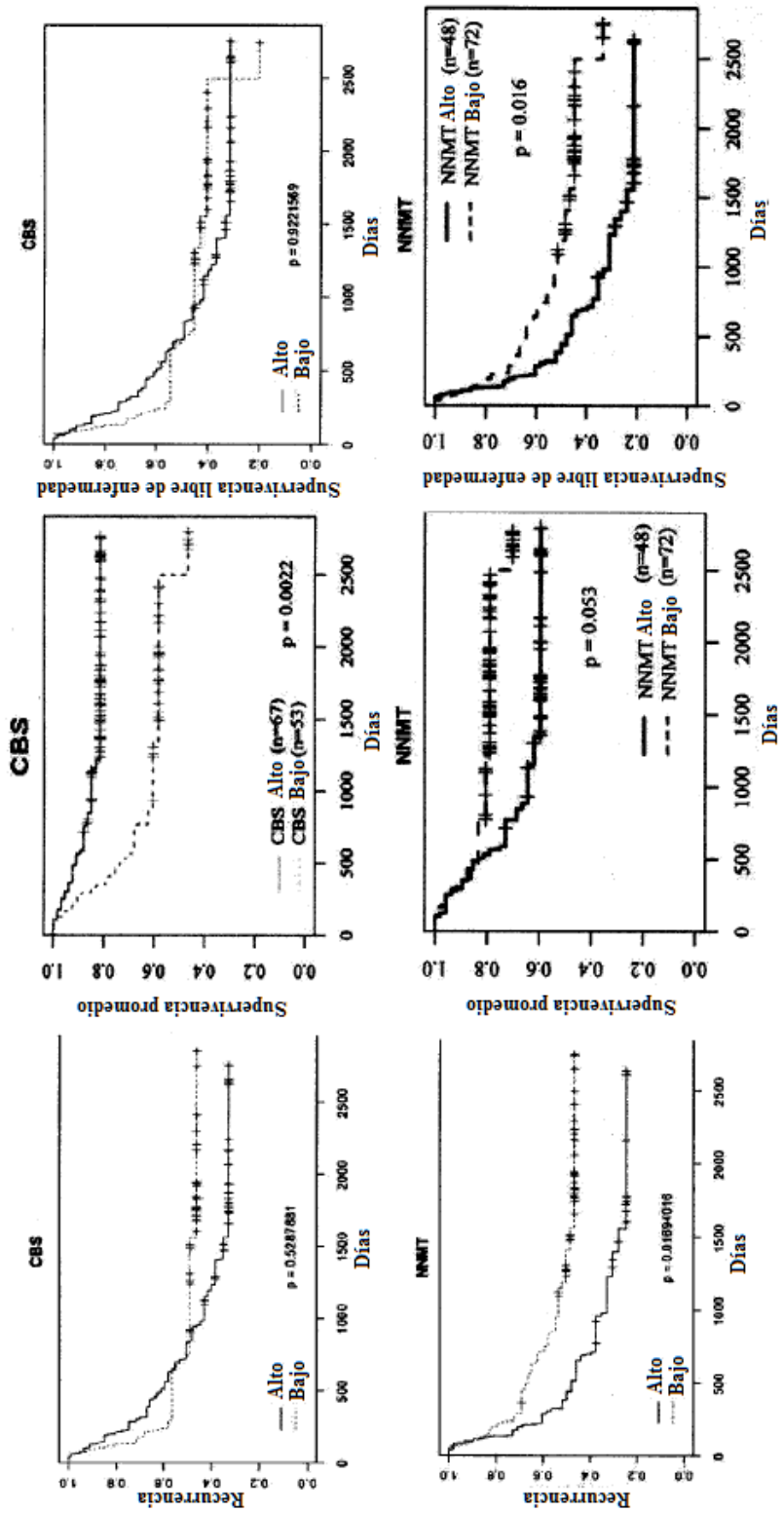
2. Un método para estimar el pronóstico de supervivencia general en un paciente con cáncer de hígado que comprende:

etapa 1, poner en contacto una muestra biológica recolectada del paciente que tiene cáncer de hígado con una composición que comprende una sustancia para detectar específicamente el nivel existente de la proteína codificada por el gen CBS; y

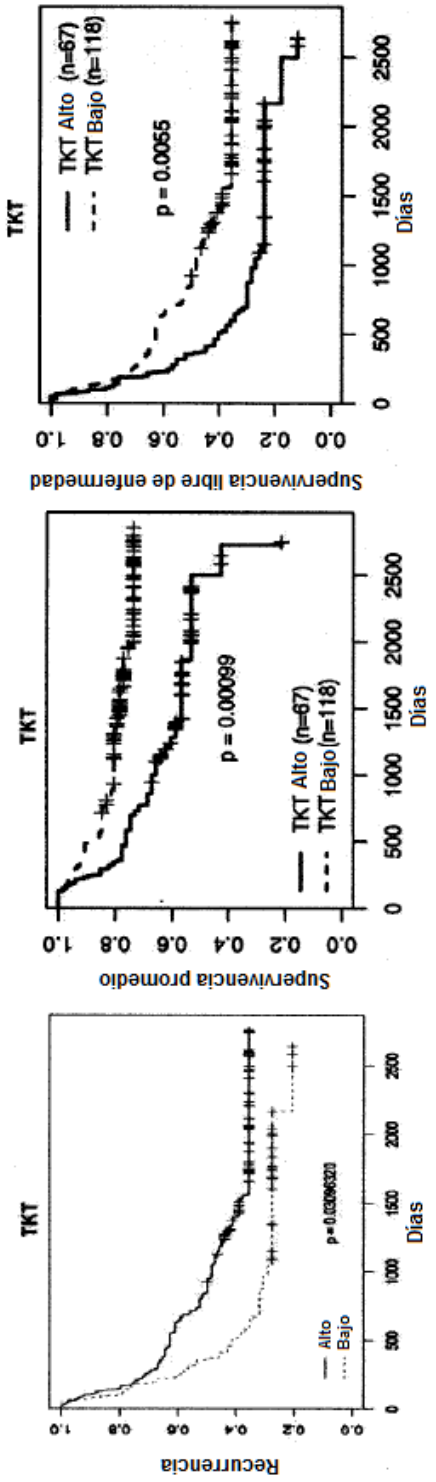
etapa 2, detectar diferencias en el nivel existente de la proteína codificada por el gen CBS al comparar el resultado del tratamiento de la etapa 1 con un valor de referencia;

en donde se pronostica la supervivencia general del cáncer de hígado, y en donde el nivel existente de la proteína codificada por el gen CBS mayor que el valor de referencia indica que el pronóstico de supervivencia general es relativamente bueno.

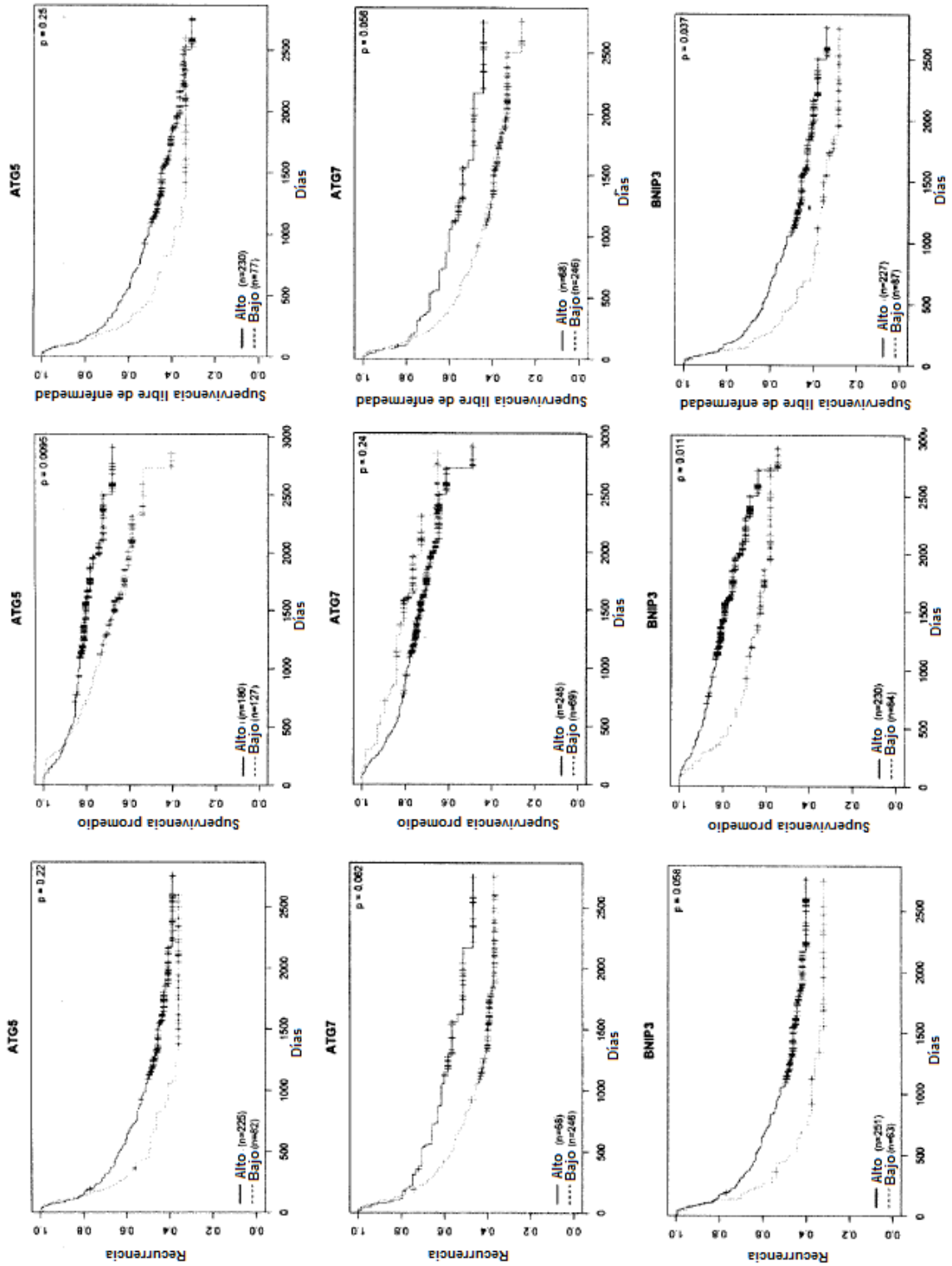
[Fig. 1]


CBS
Supervivencia libre de enfermedad
Alto
Bajo
p = 0.9221569
Dias
NNMT
NNMT Alto (n=48)
NNMT Bajo (n=72)
p = 0.016
CBS
CBS Alto (n=67)
CBS Bajo (n=53)
p = 0.0022
Supervivencia promedio
p = 0.053
Recurrencia
p = 0.5287881
p = 0.01894016

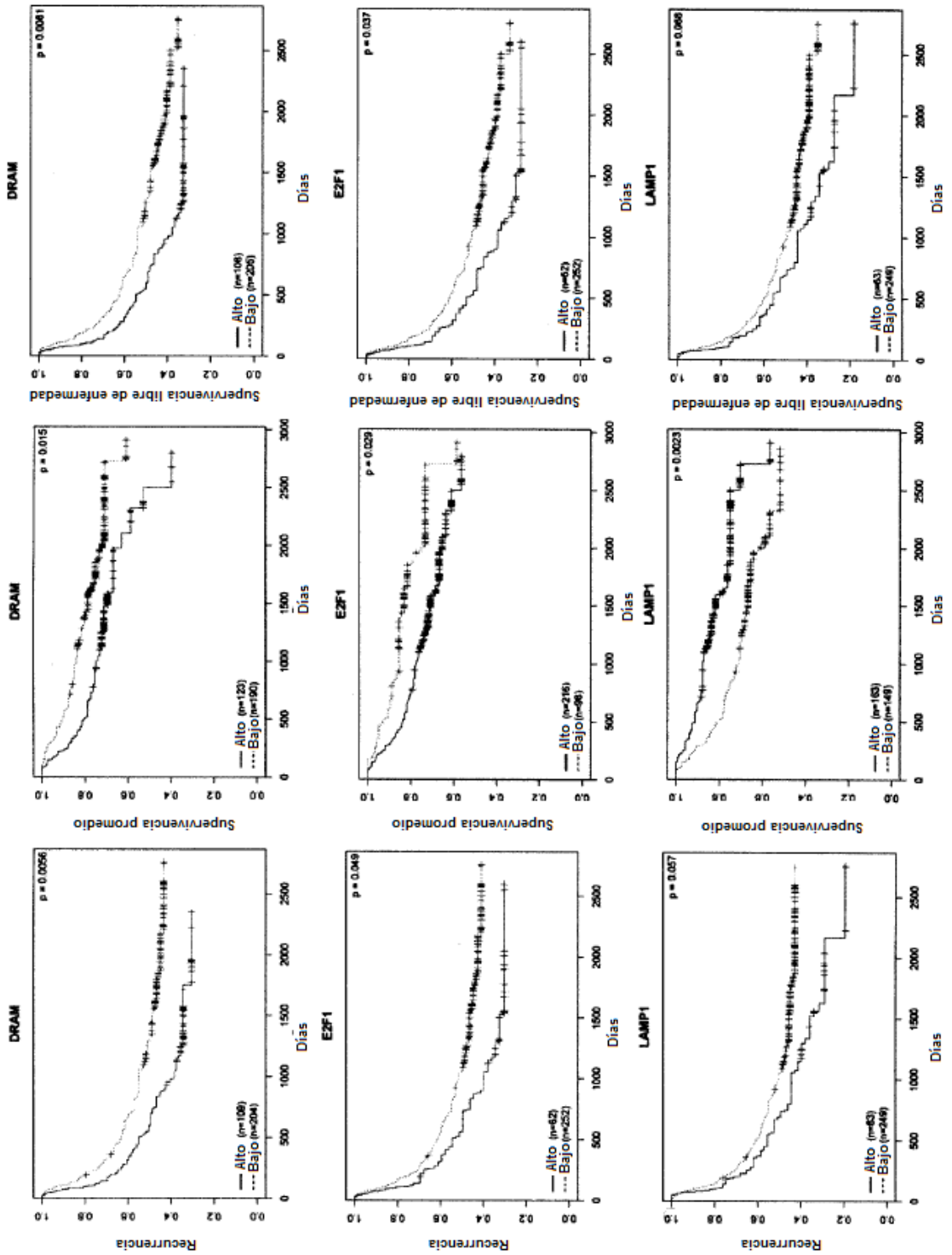
[Fig. 2]


TKT
TKT Alto (n=67)
TKT Bajo (n=118)
p = 0.0055
Supervivencia libre de enfermedad
Dias
TKT
p = 0.00099
TKT Alto (n=67)
TKT Bajo (n=118)
Supervivencia promedio
Dias
TKT
Alto
Bajo
Recurrencia
Dias

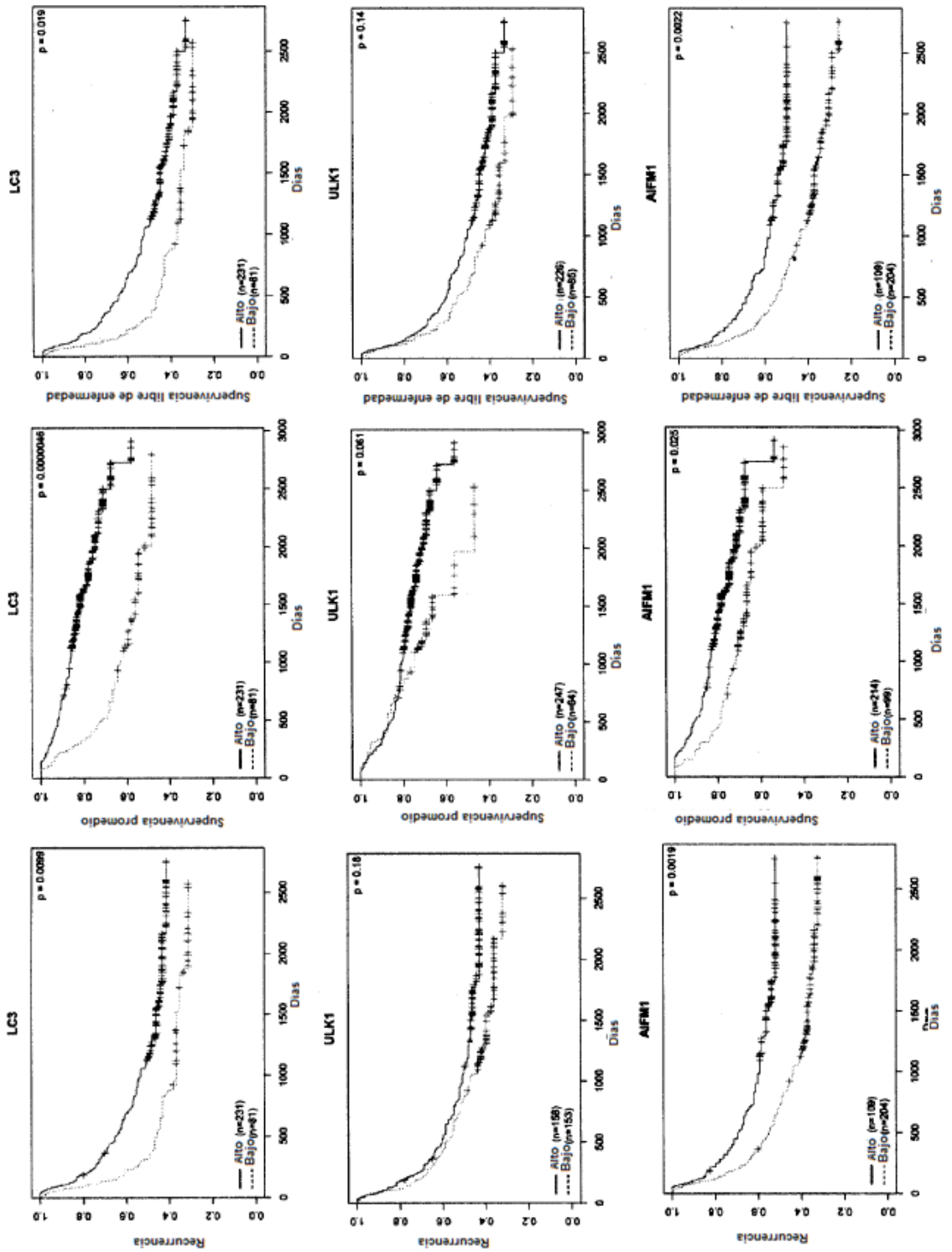
[Fig. 3]


ATG5
ATG7
BNIP3
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Días
Alto
Bajo

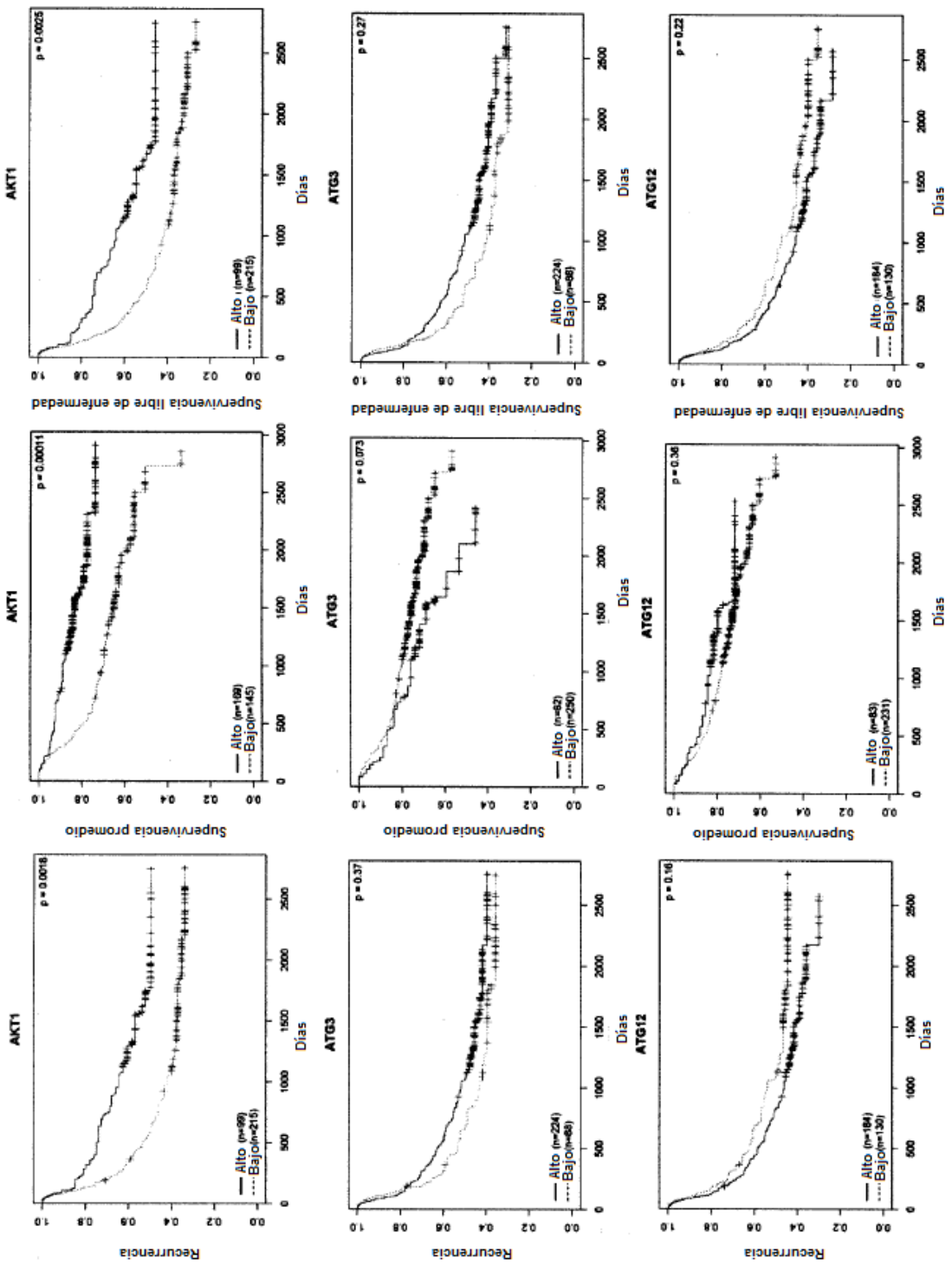
[Fig. 4]


DRAM
E2F1
LAMP1
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Dias
Alto
Bajo

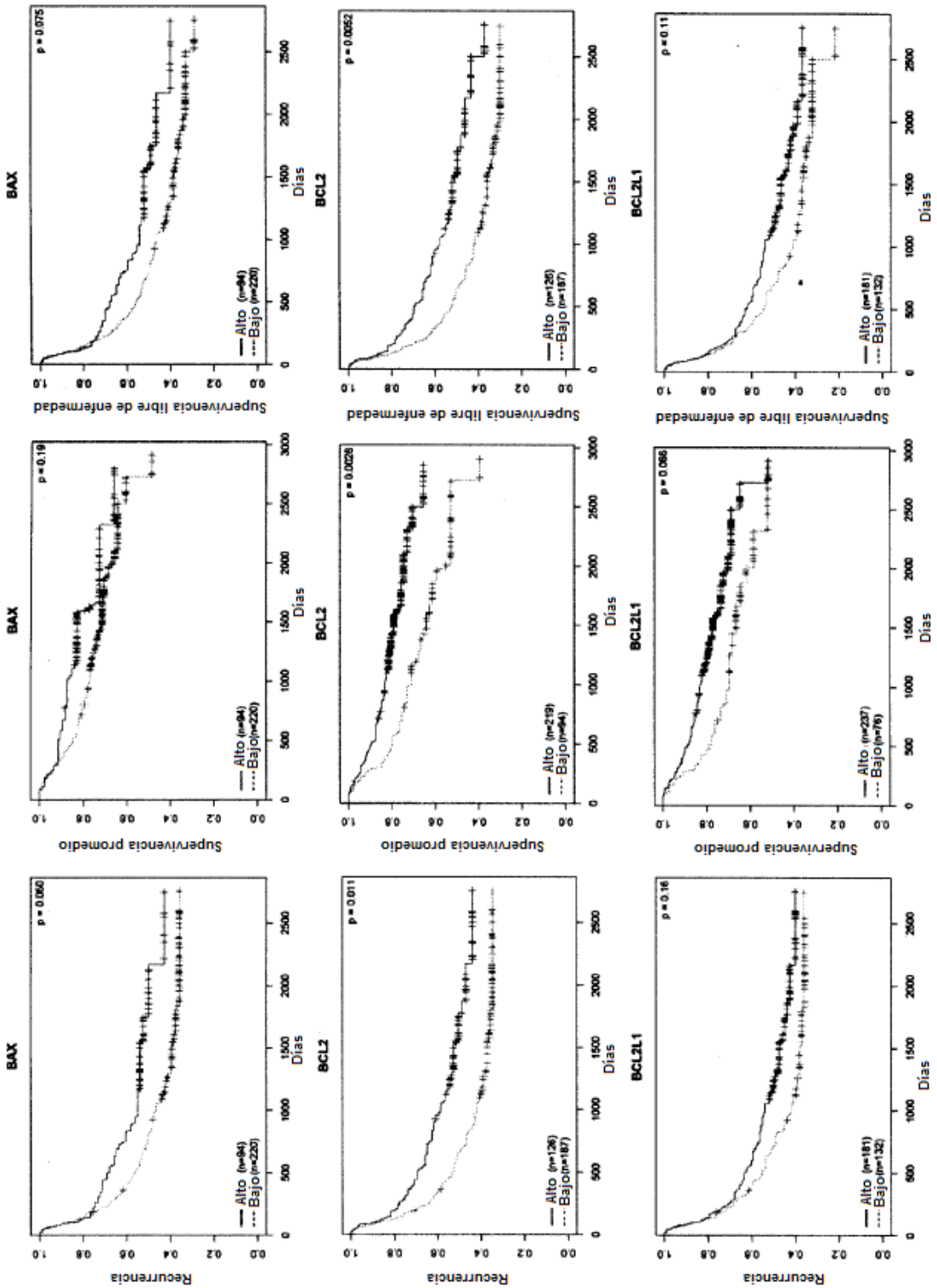
[Fig. 5]


LC3
ULK1
AIFM1
p = 0.019
p = 0.14
p = 0.0022
p = 0.0000046
p = 0.061
p = 0.025
p = 0.0099
p = 0.18
p = 0.0019
Alto (n=231)
Bajo(n=81)
Alto (n=226)
Bajo(n=86)
Alto (n=106)
Bajo(n=204)
Alto (n=247)
Bajo(n=64)
Alto (n=214)
Bajo(n=99)
Alto (n=158)
Bajo(n=153)
Alto (n=139)
Bajo(n=204)
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Dias

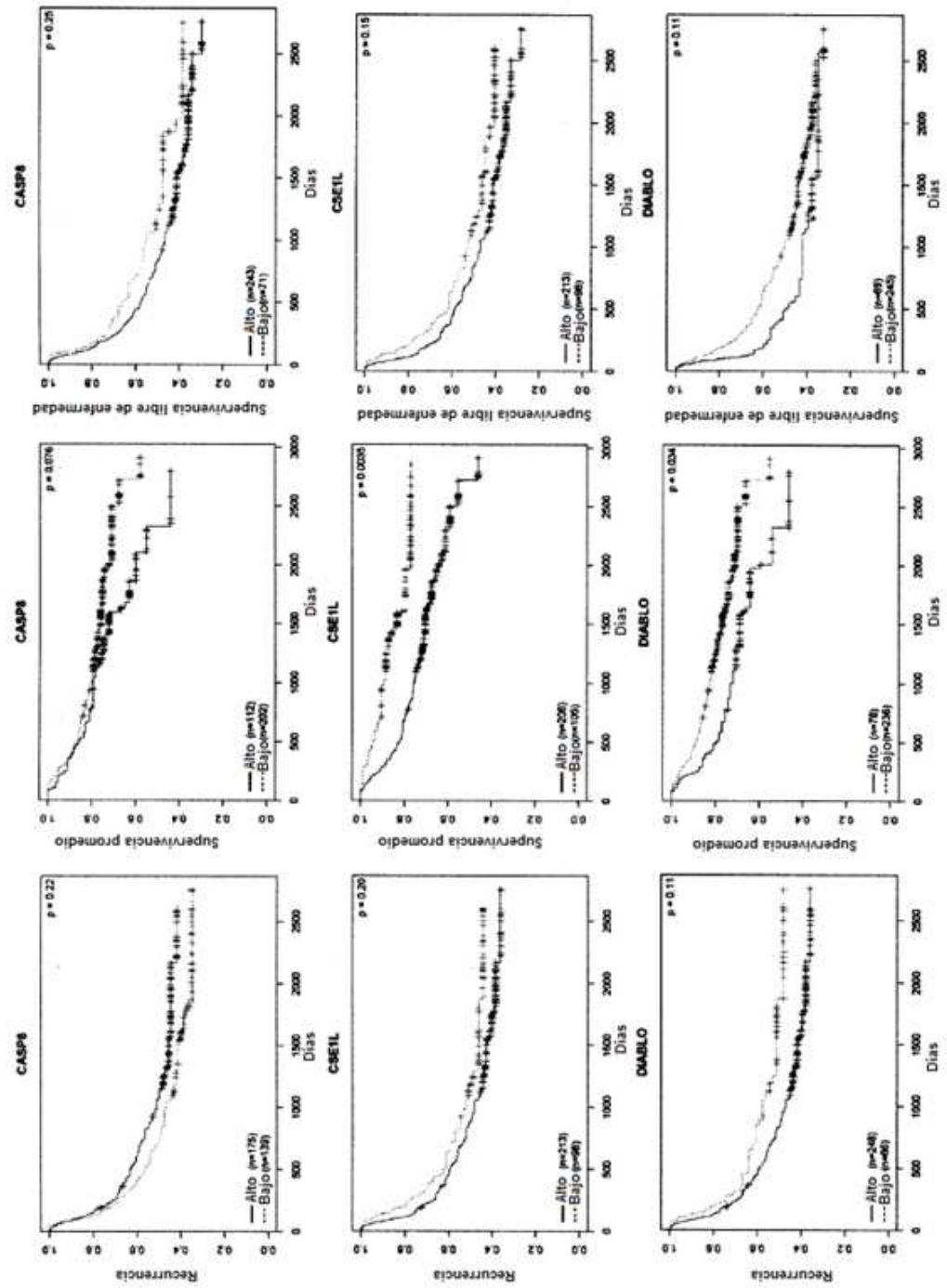
[Fig. 6]


AKT1
ATG3
ATG12
p = 0.0025
p = 0.27
p = 0.22
p = 0.00011
p = 0.073
p = 0.36
p = 0.0018
p = 0.37
p = 0.16
Alto (n=99)
Bajo (n=215)
Alto (n=224)
Bajo (n=88)
Alto (n=184)
Bajo (n=130)
Alto (n=189)
Bajo (n=145)
Alto (n=82)
Bajo (n=250)
Alto (n=83)
Bajo (n=231)
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Dias
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000

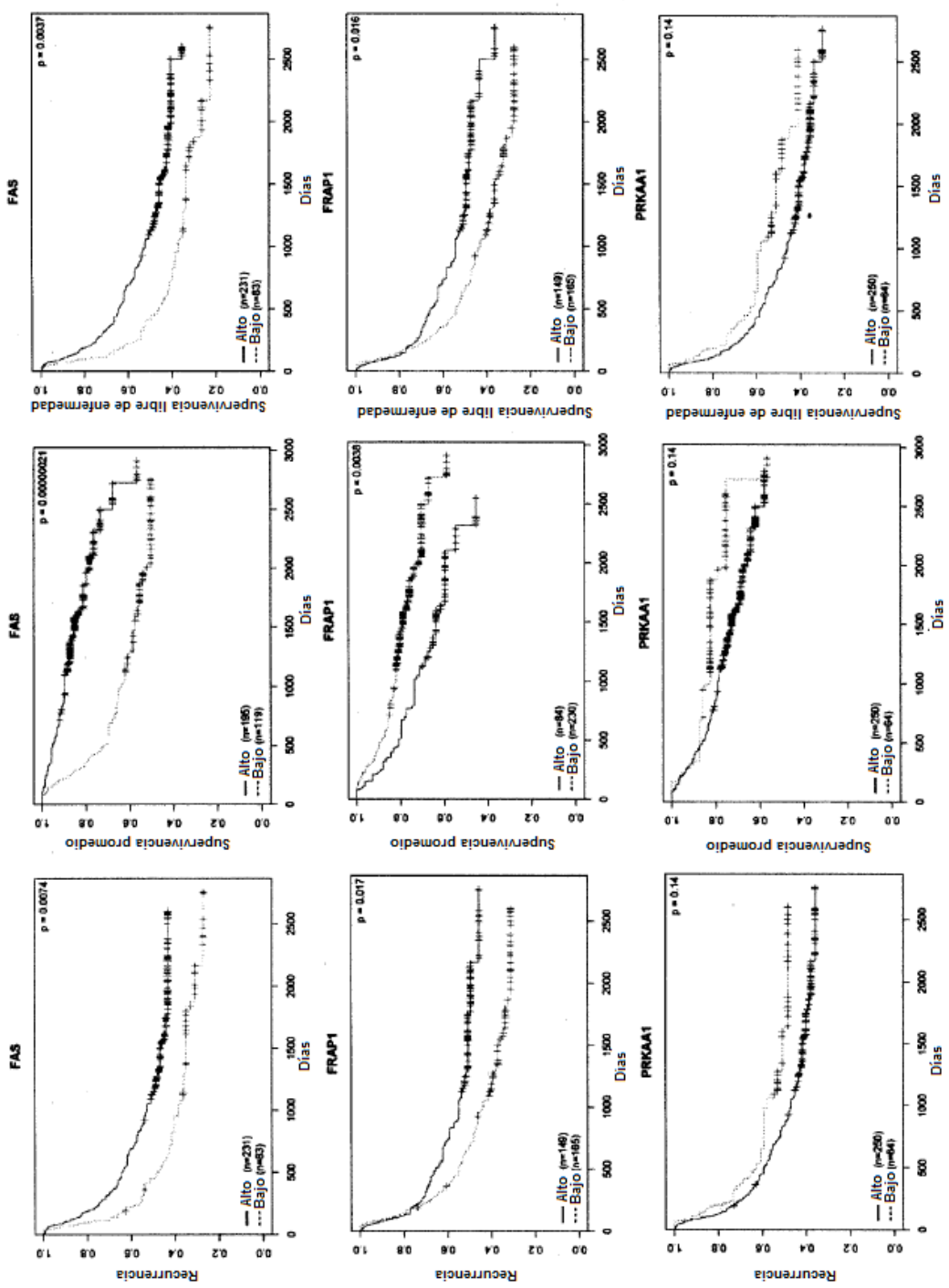
[Fig. 7]


BAX
BCL2
BCL2L1
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Días
Alto
Bajo
p = 0.075
p = 0.0052
p = 0.11
p = 0.19
p = 0.0028
p = 0.066
p = 0.050
p = 0.011
p = 0.16

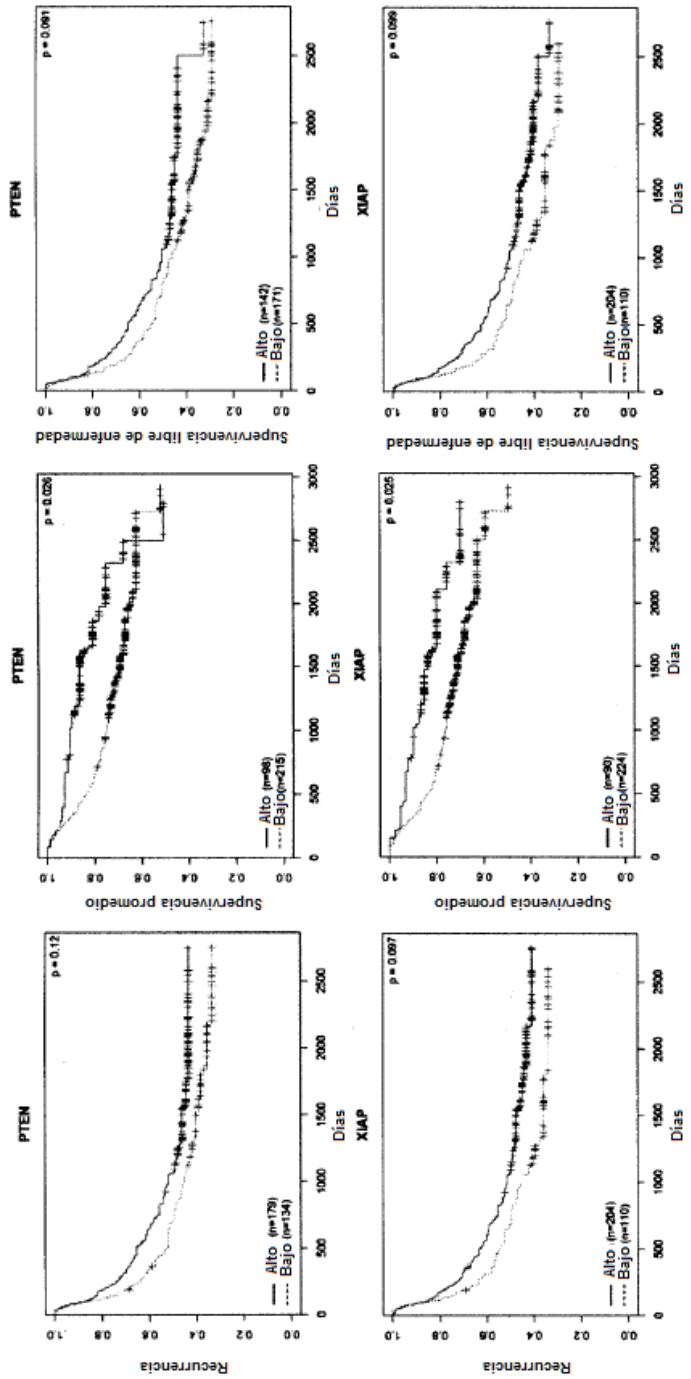
[Fig. 8]


CASP8
CSE1L
DIABLO
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Días
Alto
Bajo

[Fig. 9]


FAS
FRAP1
PRKAA1
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Días
Alto
Bajo

[Fig. 10]


PTEN
XIAP
Supervivencia libre de enfermedad
Supervivencia promedio
Recurrencia
Días
Alto
Bajo
p = 0.091
p = 0.099
p = 0.026
p = 0.025
p = 0.12
p = 0.097