

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 986**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2006 PCT/KR2006/005836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07100183**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06835536 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 1989552**

54 Título: **Marcadores proteicos para diagnosticar cáncer de estómago y kit de diagnóstico que usa los mismos**

30 Prioridad:

28.02.2006 KR 20060019517

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**BIOINFRA INC. (100.0%)
8th Fl., Cancer Research Institute Seoul National
University, College of Medicine, 28, Yongon-
dong, Chongno-gu
Seoul 110-799, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHUL WOO;
OHN, SYNG-YUP;
HAN, MI YOUNG y
SHIN, YONG-SUNG**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 623 986 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcadores proteicos para diagnosticar cáncer de estómago y kit de diagnóstico que usa los mismos

[Campo técnico]

- 5 La presente invención se refiere a marcadores proteicos para su uso en el diagnóstico de cáncer de estómago, más precisamente a marcadores proteicos para su uso en el diagnóstico de cáncer de estómago examinados mediante electroforesis en gel bidimensional y bioinformática, así como a un método de examen *in vitro* de identificación de un grupo con alto riesgo de padecer cáncer de estómago.

[Técnica anterior]

- 10 El cáncer es ahora una causa principal de muerte superando a la enfermedad cardíaca en el siglo XXI. Por tanto, la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer son preocupaciones principales en todo el mundo. Corea no es una excepción. Desde 1988, el cáncer ha sido la principal causa de muerte en Corea. En el caso del cáncer de estómago, se ha reducido en países americanos y europeos, pero todavía muestra la mayor frecuencia de aparición en Corea y Japón. Según el informe del registro de cáncer, Seúl, Corea (1992-95), los pacientes con cáncer de estómago constituyen el 23% de los pacientes con cáncer totales (hombres: el 24,7%, mujeres: el 17,3%). La edad promedio de aparición son los 54 años, principalmente 40 – 60, pero la edad de los 20 años constituye aproximadamente el 3% y la frecuencia de la enfermedad en hombres es el doble que en mujeres. Sin embargo, una vez diagnosticado de manera temprana, la tasa de supervivencia es de al menos el 90%, lo que sugiere que el diagnóstico temprano de cáncer de estómago es muy importante para la vigilancia de la atención sanitaria nacional.

- 20 La tumorigénesis, la progresión y el cambio maligno son el resultado de la acción combinada tanto de factores genéticos como de factores ambientales para dar como resultado cambios en el proteoma. La correlación entre el nivel de concentraciones moleculares de proteínas, implicadas directamente en las rutas de metabolismo y regulación esenciales para la supervivencia de todas las células incluyendo las células cancerosas, y el nivel de ARNm relevante es muy baja (coeficiente de correlación = 0,48), por lo que el enfoque centrado en el ARNm basado en el examen de alto rendimiento de un gen diana podría conducir a un malentendido sobre las funciones biológicas de la proteína diana. La actividad, la estabilidad, la ubicación intracelular y el recambio de la proteína implicada en la supervivencia, la diferenciación y la muerte celulares se regulan mediante diversas modificaciones postraduccionales (PTM). Por tanto, es más importante analizar un proteoma que centrarse en el ARNm.

- 30 El cáncer es una enfermedad sistémica, en la que están implicados más funciones y procesos biológicos de diversos órganos en lugar de uno o dos tipos de células o tejidos. Por tanto, han de examinarse tales muestras clínicas, que pueden reflejar todos los cambios en el proteoma, tales como, en suero o líquido corporal. De hecho, el diagnóstico clínico general se ha realizado a través del análisis del líquido corporal. Por tanto, desarrollar un método de diagnóstico novedoso usando líquido corporal que facilite el examen primario eficaz podría preparar el camino hacia una mejora significativa de la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer.

- 35 La combinación de biotecnología (BT) y tecnología de la información (IT) dio lugar a la bioinformática y la bioelectrónica que facilitan el análisis fácil, rápido y eficaz de una enorme cantidad de datos. En particular, la bioinformática es una técnica para recoger, almacenar y analizar la enorme cantidad de información que contiene un organismo vivo, y usar tal información en el campo del desarrollo de fármacos, producción de alimentos, agricultura y actividades medioambientales, etc., dando como resultado el establecimiento de información biológica S/W, servicio de información biológica e infraestructura de tecnología de la información. La extracción de información de imágenes es una nueva técnica de aplicación de bases de datos, que es una combinación técnica de técnica de bases de datos de imágenes y técnica de extracción de información de datos. La diferencia de la extracción de información de datos general probada en el campo de la bioinformática, la extracción de información de imágenes es una técnica novedosa nunca antes probada de manera nacional ni en el extranjero. Las técnicas de extracción de información de datos general se basan en estadísticas aplicadas, lo que sugiere es limitada a la hora de obtener información relevante precisa. Por ejemplo, se espera que las manchas de proteomas, observadas en la imagen obtenida mediante electroforesis en gel bidimensional, incluya información sobre el estado patológico (normal o enfermo) y diversas características del paciente. Por tanto, si es posible extraer información relevante usando la técnica de extracción de información de imágenes, el método de diagnóstico y la predicción del pronóstico, dependiendo del estadio y la clasificación histopatológica, mejorará y/o se complementará significativamente.

- 50 La patente coreana n.º 2004-0055893 describe el método de generación de moldes automático para construir redes de interacción de proteínas y la patente coreana n.º 2003-0092462 describe el método y el kit para diagnóstico del estadio de progresión del cáncer investigando el nivel de la proteína p53 o la proteína Bcl-X L o la correlación de las dos y la proteína Bcl-2. Sin embargo, estas dos descripciones no incluyen las explicaciones sobre el desarrollo del marcador de cáncer de estómago mediante el uso de electroforesis en gel bidimensional y bioinformática.

- 55 Se conoce proporcionar biomarcadores basándose en enfoques proteómicos, por ejemplo, de los documentos US2004/0121 343 A1 y HE Q. Y. *et al.*: "Proteomics in biomarker discovery and drug development" J. CELL BIOCHEM. vol. 89, n.º 5, agosto de 2003, páginas 868-886. El documento EP 1 394 182 A1 se refiere a agentes y métodos para el diagnóstico y la terapia del cáncer y la identificación de marcadores relacionados con cáncer. Tanto

el documento de KIM J.S.: "Identification of a possible marker protein for gastric cancer by proteomic analysis" MASTER THESIS OF COLLEGE OF PHARMACY, CHOONG-ANG UNIVERSITY (COREA) 2002 como el de RYU J. W. *et al.*: "The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer" J. KOREAN MED. SCI. vol. 18, 2003, páginas 505-509 se refieren a la identificación de proteínas marcadoras para el cáncer gástrico mediante el análisis proteómico. JANG J. S. *et al.*: "The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates" ONCOL. RES. vol. 14, n.º 10, 2004, páginas 491-499 se refiere a un perfil de proteoma diferencial de cáncer de estómago para la identificación de candidatos de biomarcador, y HE Q. Y. *et al.*: "Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma" PROTEOMICS vol. 4, n.º 10, octubre de 2004, páginas 3276-3287 da a conocer alteraciones proteómicas en adenocarcinoma gástrico.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para examinar una proteína marcadora para diagnosticar cáncer de estómago, que difiere de manera característica en su expresión en cáncer de estómago, usando electroforesis en gel bidimensional y bioinformática y un uso del marcador como marcador de diagnóstico temprano para cáncer de estómago.

[Solución técnica]

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un método de examen para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago según la reivindicación 1.

La presente invención también proporciona un uso de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG) como marcador para diagnosticar cáncer de estómago.

La presente invención proporciona además un uso de LRG y/o un anticuerpo contra LRG en un método de examen *in vitro* para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago.

A continuación se facilitan las descripciones de los términos usados en la presente invención para ayudar en la comprensión de la presente invención.

"Marcador" indica la sustancia, que se encuentra claramente en la muestra de suero de un paciente con enfermedad determinado, pero no en muestras de suero normales. El marcador o marcadores comprenden un único polipéptido o una combinación de polipéptidos.

"Patrón de proteomas" indica un grupo de polipéptidos específicos o una agrupación de polipéptidos encontrados claramente en la muestra de suero obtenida de un paciente con una enfermedad determinada pero no en las muestras de suero normales. Por ejemplo, en este criterio se incluye un grupo de proteínas en suero que muestran cambios específicos en su nivel debido a enfermedad y/o la morfología y ubicación bidimensional del grupo.

"Extracción de información de datos" indica el procedimiento diseñado para encontrar la correlación entre datos relevantes, más precisamente, el procedimiento en el que se extrae un nuevo modelo de datos de los datos almacenados en la base de datos, que no se ha dado a conocer todavía, e información útil en el futuro es tomada del nuevo modelo de datos y aplicada a la toma de decisiones. Es decir, se extrae información relevante investigando patrones ocultos en los datos.

A continuación en el presente documento se describe la presente invención en detalle.

La presente invención proporciona un método de examen para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago que comprende las etapas tal como se define en la reivindicación 1.

Los presentes inventores obtuvieron muestras de suero de individuos sanos normales y pacientes con cáncer, seguido por tratamiento de imágenes bidimensionales para el proteoma de suero. Entonces, se aplicó bioinformática para analizar los datos preparados y como resultado se identificaron las proteínas marcadoras óptimas que podían distinguir un individuo normal de un paciente con cáncer.

En particular, los presentes inventores realizaron electroforesis en gel bidimensional para establecer datos de imágenes de proteínas que muestran cambios significativos en el nivel de expresión según el desarrollo del cáncer (en el presente documento, cáncer de estómago), a los que se aplicaron técnicas de bioinformática, dando como resultado el establecimiento de un uso novedoso de los marcadores proteicos para diagnosticar cáncer de estómago. En primer lugar, se recogieron sueros tanto de personas sanas como de pacientes con cáncer. Los pacientes con cáncer de estómago eran hombres con una edad promedio de 58,7 años (edad de entre 33 - 78) y mujeres con una edad promedio de 56,2 años (edad de entre 29 - 77) (véase la tabla 1).

Se investigaron las condiciones óptimas para la electroforesis en gel bidimensional para examinar proteomas de suero. Como resultado, para dar los mejores resultados, se usó una tira de 13 cm, el intervalo de pH fue de 4-7, los voltios-hora totales para la IEF (isoelectroenfoque) fueron 62.000 Vh, la cantidad de proteína de suero cargada fue

de 200 ug, y la composición del tampón de rehidratación fue urea 8 M.

Tras completarse la electroforesis, se detectaron proteínas mediante patrones de tinción. Para detectar manchas en las imágenes de gel de electroforesis bidimensional, se usó un programa informático para establecer bases para la comparación de imágenes. En particular, se detectaron manchas mediante filtración de imágenes, sustracción de fondo, eliminación de rayas verticales y horizontales y comparación de variantes usando un programa informático. Y se estableció la base de datos con los resultados.

Cuando se midieron las muestras y se estableció de ese modo la base de datos, se analizaron los datos mediante enfoque de bioinformática. El software usado en bioinformática puede constituir códigos para cambiar los datos de imágenes en códigos legibles, lo que incluye el código para aplicar un algoritmo a la información sobre los marcadores proporcionados por la presente invención. Se usaron diversas técnicas de bioinformática para examinar un marcador proteico asociado con cáncer de estómago. El análisis usado en la presente solicitud usando técnicas de bioinformática comprende las etapas de generar un ejemplo del proteoma que porta el patrón de proteoma específico de enfermedad y entrenar para establecer la base de datos (fase de entrenamiento); y extraer datos específicos de proteoma de suero diana y compararlos con el proteoma específico de enfermedad anterior para determinar la aparición de la enfermedad en el proteoma de suero diana (fase de pruebas).

“Entrenamiento” en el presente documento indica la generación de un modelo de clasificación mediante algoritmo usando datos establecidos de muestras conocidas de pacientes con cáncer de estómago y personas sanas normales. En este momento, los datos usados para generar un modelo de clasificación se denomina “conjunto de datos de entrenamiento” y los grupos que proporcionan los datos se denominan “grupos de entrenamiento”. Una vez terminado el entrenamiento, el modelo de clasificación reconoce un patrón de datos de muestras desconocidas y lo clasifica.

Una máquina de vectores de soporte es un programa de aprendizaje que facilita el reconocimiento de patrones, que puede tratar múltiples variantes al mismo tiempo y clasificarlas. Esta máquina de vectores de soporte puede interpretar datos no lineales de la zona de entrada para dar datos lineales y proporcionar un límite óptimo (plano de separación óptimo o hiperplano) entre cada característica. La máquina de vectores de soporte se divide mayoritariamente en proceso de entrenamiento y proceso de evaluación. En el proceso de entrenamiento, se genera un vector de soporte. Y en el proceso de evaluación, se realiza la valoración considerando características especificadas. La muestra se compone de n objetos, y el i-ésimo objeto se representa como el vector x_i que comprende p variantes y entonces la clase correspondiente que se ha clasificado previamente se indica como y_i . Por tanto, si hay dos clases, y_i es o bien “1” o bien “-1” (cáncer o normal). La función discriminante para el patrón de entrada aleatorio es tal como sigue.

$$D(x) = \text{signo}(wx + b) = \begin{cases} +1, & \text{si } wx + b \geq 0 \\ -1, & \text{si } no \end{cases}$$

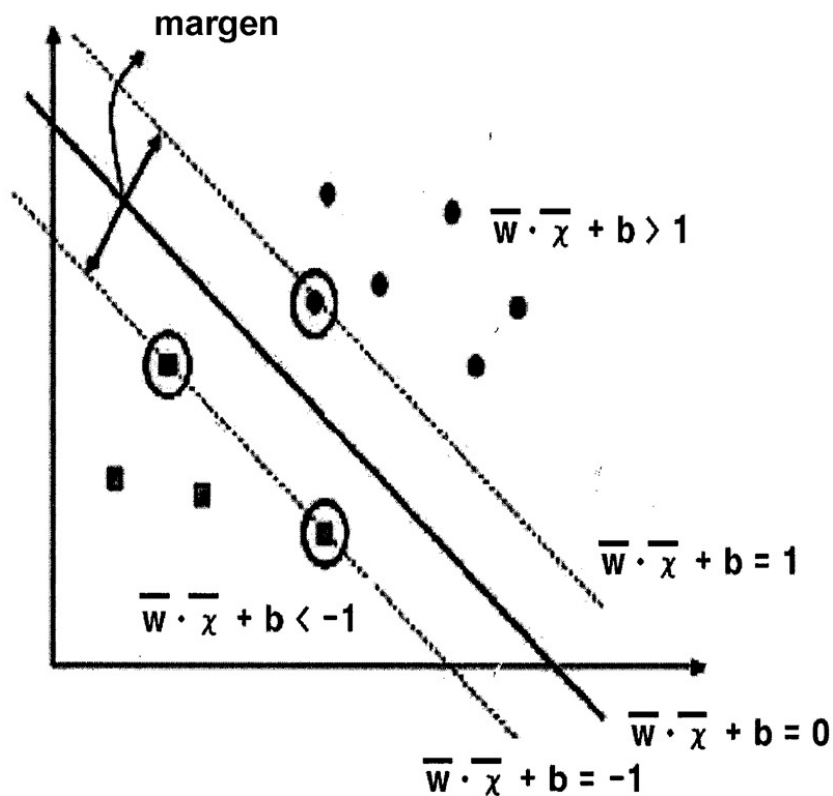
w: vector de peso

b: umbral

El hiperplano óptimo que divide los datos en dos clases es la línea discontinua en el gráfico siguiente. Las dos líneas discontinuas y el margen (d) son tal como sigue.

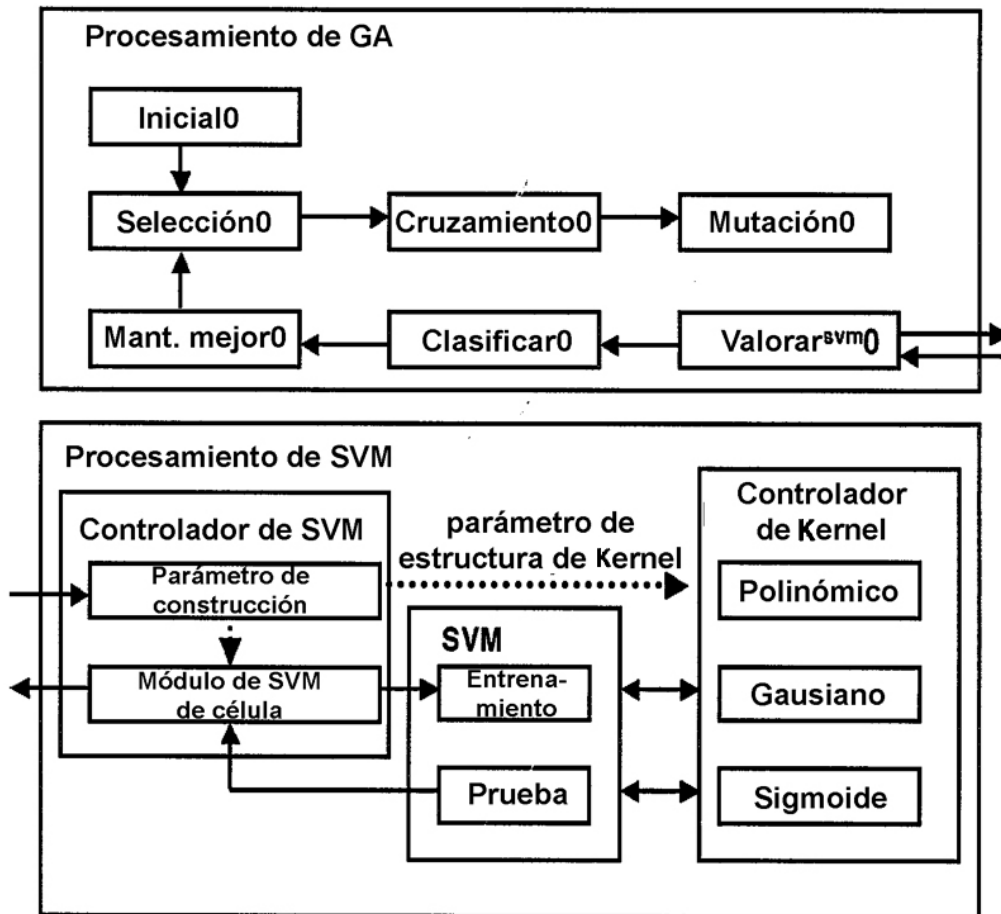
$$(w \cdot x) + b = \pm 1, d = 2 / \|w\|$$

Para diseñar un vector de soporte adecuado para el fin, han de determinarse el vector de peso (w) y el límite (b). Es decir, según la fórmula: $y[(w \cdot x) + b] \geq 1$, se examinan w y b que pueden minimizar $\|w\|$.



El algoritmo genético está creando un modelo de ingeniería a partir de sistemas genéticos y evolutivos del mundo natural, que está abordando la capacidad de adaptación de una vida al entorno. Las posibles soluciones para una cuestión se expresan de forma determinada y entonces se modifican gradualmente para producir soluciones más valiosas. En particular, un algoritmo genético es un tipo de algoritmo de optimización para buscar un valor x calculando el valor máximo o el valor mínimo de la función $f(x)$ contra la variante x definida en un área específica, lo más rápido posible. El algoritmo genético se compone de las siguientes etapas: determinar el genotipo que codifica para y convierte factores genéticos en una serie de símbolos; determinar el grupo genético inicial para generar diversos individuos que tienen diferentes características a partir del genotipo definido anterior; evaluar la adaptación de cada individuo para calcular la adaptación según el método predefinido; seleccionar individuos basándose en la adaptación evaluada con el fin de determinar la distribución de supervivencia de los individuos; aparear sustituyendo un gen entre dos cromosomas para generar un nuevo individuo; mutar modificando una parte de un gen y maximizar la diversidad del grupo genético para preparar individuos que proporcionen mejores soluciones; y volver a la etapa de evaluar la adaptación de cada individuo. El algoritmo genético facilita la búsqueda de soluciones según la manipulación genética cooperativa sobre la selección, apareamiento, etc., entre múltiples individuos. Por tanto, en comparación con el método de examen paralelo convencional para soluciones, el algoritmo genético es fácil y sencillo para soluciones de examen.

El proceso de vinculación de GA con SVM es tal como sigue.



Entre los datos de proteoma obtenidos de 311 voluntarios (pacientes con cáncer de estómago; 143, personas sanas normales; 168), se seleccionaron aleatoriamente 100 de los pacientes con cáncer de estómago y las personas normales y formaron un grupo de entrenamiento y un grupo de evaluación (véase la tabla 2). Los datos del grupo de entrenamiento de 200 personas se aplicaron al algoritmo genético (GA) vinculado a máquina de vectores de soporte (SVM) (véase la patente coreana n.º 10-2002-0067298 "Method and System for Analysis of Cancer Biomarkers Using Proteome Image Mining") y como resultado se encontraron 9 marcadores para diagnosticar cáncer de estómago y se construyó una base de datos. Se calcularon los valores medios de pacientes con cáncer y personas normales con cada punto en la base de datos, que luego se compararon. Se realizó una prueba de la t para calcular el valor de p de cada grupo y 9 puntos mostraron diferencias significativas en la expresión (véase la tabla 3).

Se realizaron validación cruzada y bosque aleatorio (*random forest*), otras técnicas de bioinformática, con las proteínas del grupo de entrenamiento. Como resultado, el índice de decisión de cáncer de estómago (sensibilidad – diagnosticar un paciente con cáncer como cáncer; especificidad – diagnosticar una persona normal como normal) fue alto según el método de la invención. Se obtuvo de nuevo el bosque aleatorio con los datos de 111 personas restantes que no se habían incluido en el grupo de entrenamiento (pacientes con cáncer de estómago: 43, personas sanas normales: 68), y como resultado dos algoritmos mostraron hasta un 80% exactitud de diagnóstico. Por tanto, se confirmó que 9 proteínas marcadoras candidatas para diagnosticar cáncer de estómago eran muy útiles. Para apoyar el resultado, se realizó inmunotransferencia y el resultado fue coherente, es decir, los candidatos de proteína marcadora mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión entre sueros normales y sueros de pacientes con cáncer de estómago.

Los datos de 143 pacientes con cáncer de estómago totales (grupo de entrenamiento: 100, grupo de evaluación: 43) se dividieron por estadio de cáncer y se investigaron las expresiones de estas 9 proteínas según el estadio. Tal como se muestra en la figura 3, cada proteína mostró expresiones diferentes según el estadio. Las expresiones de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG), clusterina, alfa-1-antitripsina, proapolipoproteína A-I, haptoglobina beta, haptoglobina alfa-2 y apolipoproteína H fueron superiores en pacientes con cáncer de estómago que en el grupo sano normal, mientras que las expresiones de apolipoproteína A-IV y transtiretina estaban reducidas en pacientes con cáncer de estómago. Por tanto, esas 9 proteínas marcadoras están asociadas presumiblemente con la progresión de cáncer de estómago, lo que apoya la capacidad de uso de estas proteínas como biomarcadores para diagnosticar cáncer de estómago.

Los marcadores de la presente solicitud facilitan los métodos de examen, concretamente proteomas de sueros diana que iban a investigarse para detectar cáncer de estómago se introdujeron y se cambiaron para dar una imagen bidimensional, que entonces se comparó con la muestra que tiene el patrón de proteína marcadora específica de enfermedad. O bien se compararon las expresiones de estas proteínas marcadoras en los sueros diana con las de sueros normales, y estas expresiones se transformaron en valores numéricos. A partir de la comparación de estos valores, pudo valorarse si el suero diana es normal o con cáncer.

La presente solicitud también proporciona el uso de la proteína seleccionada del grupo que consiste en alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG), clusterina, alfa-1-antitripsina, apolipoproteína A-IV, transtiretina, proapolipoproteína A-I, haptoglobina beta, haptoglobina alfa-2 y apolipoproteína H como marcador para diagnosticar cáncer de estómago.

Las 9 proteínas anteriores pueden usarse como marcadores para diagnosticar cáncer de estómago puesto que se confirmó que estaban asociadas con progresión de cáncer de estómago.

La presente solicitud proporciona además un kit de diagnóstico para cáncer de estómago que contiene reactivo de captura primario que se une a uno o más marcadores para diagnosticar cáncer de estómago seleccionados del grupo que consiste en alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG), clusterina, alfa-1-antitripsina, apolipoproteína A-IV, transtiretina, proapolipoproteína A-I, haptoglobina beta, haptoglobina alfa-2 y apolipoproteína H; y reactivo de captura secundario que no se une al primer reactivo de captura.

El kit de diagnóstico puede usarse para detectar uno o más marcadores de la invención que muestran expresiones diferentes en pacientes con cáncer de estómago. El kit de diagnóstico de la presente invención facilita no sólo el diagnóstico de cáncer por un médico, sino también la monitorización de la respuesta tras la atención de un paciente, con el fin de modificar el tratamiento. El kit también puede usarse para identificar un compuesto que regula la expresión *in vivo* o *ex vivo* de uno o más marcadores en modelos de cáncer de estómago (por ejemplo: modelos animales tales como ratones, ratas, etc.).

El reactivo de captura primario es un anticuerpo o un quelato metálico, más preferiblemente un anticuerpo. El reactivo de captura secundario es un conjugado marcado con una enzima de color, una fluoresceína, un radioisótopo o un coloide, que actúa como anticuerpo secundario. La enzima de color puede ser peroxidasa, fosfatasa alcalina o fosfatasa ácida (antes: peroxidasa de rábano). La fluoresceína puede ser ácido carboxílico de fluoresceína (FCA), isotiocianato de fluoresceína (FITC), tiourea de fluoresceína (FTH), 7-acetoxicumarin-3-ilo, fluorescein-5-ilo, fluorescein-6-ilo, 2',7'-diclorofluorescein-5-ilo, 2',7'-diclorofluorescein-6-ilo, dihidrotetrametilrosamin-4-ilo, tetrametilrodamin-5-ilo, tetrametilrodamin-6-ilo, 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-etilo o 4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-etilo.

Cuando se expone la muestra de un paciente en el reactivo de captura primario, preferiblemente un anticuerpo específico de marcador, puede diluirse la muestra antes de exponerse al anticuerpo y el anticuerpo puede fijarse en una fase sólida con el fin de usarse en las siguientes fases, incluyendo lavado o separación compleja, etc. La fase sólida puede ser vidrio o plástico tal como placa de microtitulación, varilla, perla o microperla, etc. El anticuerpo puede unirse a un sustrato de sonda o a un chip proteico. Tras incubar la muestra con el anticuerpo, se lavó la muestra y se incubó con el reactivo de captura secundario, preferiblemente un anticuerpo secundario para medir el complejo anticuerpo-marcador. La medición o detección del complejo anticuerpo-marcador puede realizarse mediante uno de los procedimientos de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, densidad óptica, reflexión y transmisión. Además de los métodos anteriores, pueden detectarse marcadores en la muestra mediante métodos indirectos tales como prueba de competencia o inhibición con un anticuerpo monoclonal que se une a otro epítipo del marcador.

El kit excluye un sustrato para reaccionar con una enzima y una proteína no unida, pero incluye disolución de lavado o eluyente que contiene biomarcadores unidos únicamente. Las muestras para el análisis incluyen suero, orina, lágrimas, saliva y otros materiales biológicos que contienen polipéptido específico de la enfermedad. Preferiblemente, las muestras son muestras de líquidos biológicos tales como sangre, suero y plasma, y más preferiblemente suero. Las muestras pueden prepararse con el fin de aumentar la sensibilidad de detección del marcador. Por ejemplo, los sueros obtenidos de pacientes pueden tratarse previamente mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de líquidos, extracción secuencial o electroforesis en gel.

[Descripción de los dibujos]

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un conjunto de fotografías que ilustran la imagen completa del proteoma de suero representativo observado en electroforesis en gel bidimensional y la concentración de urea óptima para la electroforesis en gel bidimensional.

1: imagen completa de electroforesis en gel bidimensional

2: urea 8 M

3: tiourea 2 M/urea 7

5 La figura 2 es un conjunto de fotografías que ilustran las proteínas que muestran expresiones diferentes en pacientes con cáncer, en comparación con personas sanas normales, detectadas mediante electroforesis en gel bidimensional.

La figura 3 es un conjunto de gráficos que ilustran la expresión de proteínas dependiente del estadio de cáncer de estómago.

A: Haptoglobina beta

B: Haptoglobina alfa

10 C: Alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG)

D: A1 antitripsina

E: Proapolipoproteína A-I

F: Apolipoproteína H

G: Clusterina

15 H: Apolipoproteína A-IV

I: Transtiretina

La figura 4 es un conjunto de fotografías que ilustran los niveles de expresión de proteínas marcadoras en pacientes con cáncer de estómago que son diferentes de los de personas sanas normales, detectados mediante inmunotransferencia.

20 NS: Suero normal

SC: Suero de cáncer de estómago

Haptoglobina beta

1. Marcador

2. NS 0,08 µl

25 3. SC 0,08 µl

Haptoglobina alfa

1. his-Hp α2 50 ng

2. NS 0,04 µl

3. SC 0,04 µl

30 4. NS 0,08 µl

5. SC 0,08 µl

6. Haptoglobina 50 ng

7. Marcador

Transtiretina

35 1. Marcador

2. NS 0,0016 µl

3. SC 0,0016 µl

4. NS 0,0032 µl

5. SC	0,0032 µl
6. NS	0,0064 µl
7. SC	0,0064 µl
8. NS	0,0128 µl
5 9. SC	0,0128 µl

Alfa-1-antitripsina

1. Marcador

2. NS	0,0064 µl
3. SC	0,0064 µl
10 4. NS	0,0096 µl
5. SC	0,0096 µl
6. a1 antitripsina	48 ng

[Modo para la invención]

15 Las realizaciones prácticas y preferidas actualmente de la presente invención son ilustrativas tal como se muestra en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Electroforesis en gel bidimensional<1-1> Obtención de suero

20 Se obtuvo sangre periférica de pacientes con cáncer de estómago (143 personas) en el Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Seúl, durante dos años y medio antes de que los pacientes se sometieran a cirugía y también se obtuvo sangre periférica normal obtenida de personas sanas normales (168 personas) que demostraron no tener cáncer de estómago mediante examen médico en el Green Cross Reference Lab. La sangre se obtuvo usando un tubo Vacutainer SST II (Becton Dickinson) y los sueros se separaron mediante centrifugación.

[Tabla 1]

25

Obtención de suero

sexo		edad						143 168	
hombre	mujer	20	30	40	50	60	70		
186	125	cáncer	1	11	21	40	45		25
		Normal	0	14	38	55	46		15

estadio					143
	1	2	3	4	
cáncer	53	36	34	20	

Total 311 personas

<1-2> Optimización de las condiciones para electroforesis en gel bidimensional<1-2-1> Establecimiento de método para electroforesis en gel bidimensional

30 Se comprobaron diversas condiciones experimentales para mostrar proteoma de suero. En primer lugar, la tira de gradiente de pH (IPG) inmovilizado (Amersham Bioscience) para IEF (isoelectroenfoque) tenía 13 cm de largo y el pH se fijó en el intervalo entre 4 y 7 considerando el tiempo experimental y la detección eficaz del proteoma de suero. Durante el IEF, los voltios-hora totales fueron 62.000 Vh, que se demostró que eran los voltios-hora óptimos. Se determinó que la cantidad de cada muestra para la carga era de 200 µg y la imagen completa generada en la electroforesis en gel bidimensional se muestra en la figura 1-1.

<1-2-2> Establecimiento de un método para el tratamiento de muestras

Para determinar la composición óptima del tampón de rehidratación usado para el análisis del proteoma de suero, se

compararon el estado con urea 8 M (Sigma) (figura 1-2) y el estado con urea 7 M /tiourea 2 M (Sigma) (figura 1-3). Como resultado, cuando se usó tiourea, a menudo se observaron rayas verticales, lo que dificultaba el análisis de manchas. Por tanto, se determinó que el estado óptimo para el tampón era urea 8 M (figura 1-2).

<1-2-3> Establecimiento de un método para tinción de proteínas

- 5 La tinción con plata es un método de tinción para detectar una pequeña cantidad de proteína, que se ha usado con frecuencia en los laboratorios. Sin embargo, debido a la dificultad en la reproducibilidad y al enlace covalente entre el glutaraldehído de un reactivo con una proteína diana, este método no puede usarse para espectrometría de masas MALDI-TOF. Para superar estos problemas, los presentes inventores minimizaron las desviaciones del procedimiento de tinción manteniendo estrictamente el volumen de la disolución y el tiempo de reacción
- 10 recomendados. Para construir una base de datos de imágenes, los presentes inventores tiñeron la proteína con SyproRuby (Molecular Probe) que mostraba reproducibilidad y resultados cuantitativos excelentes.

<1-3> Electroforesis en gel bidimensional

- 15 Se cargaron 200 µg de proteína de suero en disolución de SDS al 2% (Sigma)/ditiotreitól 100 mM (DTT, Sigma), seguido por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Se cargó la disolución en disolución de rehidratación (urea 8 M, CHAPS al 4% (Sigma), DTT 50 mM, tampón IPG al 0,5% (Amersham Bioscience)), seguido por agitación. Se realizó centrifugación a temperatura ambiente para separar el sobrenadante. Se realizó IEF (isoelectroenfoco) con el sistema IPGphor (Amersham Biosciences) usando la tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (pH 4-7, 13 cm Amersham Bioscience). Se realizó SDS-PAGE mediante electroforesis vertical usando gel de poliacrilamida al 12,5%. Tras la finalización de la electroforesis, se tiñeron las proteínas con SyproRuby (Molecular Probe), seguido
- 20 por detección. Se analizaron las imágenes de gel de la electroforesis en gel bidimensional mediante el programa PDQuest (Bio-Rad).

Ejemplo 2: Construcción de base de datos de imágenes

- 25 Para determinar las condiciones óptimas, se regularon diversos factores tales como filtración de imágenes, eliminación de fondo, eliminación de rayas verticales irregulares, eliminación de rayas horizontales irregulares y detección de variantes de mancha. Se detectaron manchas en las imágenes y entonces se analizaron de manera precisa 110 manchas que pudieron distinguirse específicamente. Se normalizaron las desviaciones generadas durante la medición de la muestra o las desviaciones mecánicas generadas durante la obtención de las imágenes dividiendo la cantidad de cada mancha entre la suma de todas las manchas, con el fin de regular la oscuridad de la imagen de electroforesis en gel bidimensional producida no por la diferencia en la expresión de proteínas sino por
- 30 otros factores.

Ejemplo 3: Análisis de bioinformática

Para examinar una proteína marcadora en suero, que se asocia con cáncer de estómago, se realizó análisis de bioinformática.

- 35 Tal como se muestra en la tabla 1, se seleccionaron aleatoriamente 100 personas de cada uno del grupo de pacientes con cáncer de estómago y el grupo de personas sanas normales de los datos de proteoma de las 311 personas totales (pacientes con cáncer de estómago 143 y personas sanas normales 168) para formar un grupo de entrenamiento. Los datos del grupo de entrenamiento de las 200 personas seleccionadas se vincularon con la máquina de vectores de soporte (SVM) y el algoritmo genético (GA) (véase la patente coreana n.º 10-2002-0067298 "Method and System for Analysis of Cancer Biomarkers Using Proteome Image Mining") para examinar los
- 40 candidatos de proteína marcadora para diagnosticar cáncer de estómago (tabla 3).

Se sometieron a prueba los datos de las 111 personas restantes no incluidas en el grupo de entrenamiento (pacientes con cáncer de estómago 43 y personas sanas normales 68) para confirmar la capacidad de uso de estos candidatos de proteína marcadora seleccionados del entrenamiento como marcador de diagnóstico para el cáncer de estómago. Cada fase experimental se describe en más detalle a continuación en el presente documento.

45 [Tabla 2]

Distribución de sexo, edad y estadio

(A)

grupo de entrenamiento	sexo		edad								
	hombre	mujer	20	30	40	50	60	70			
	121	79	cáncer	1	6	12	24	36	21	100	
			normal	0	7	27	27	27	12	100	
		estadio									
		1	2	3	4						
		cáncer	42	23	23	12	100				

(B)	grupo de evaluación	Sexo		edad						43 68
		hombre	mujer	20	30	40	50	60	70	
	65	46	cáncer	0	5	9	16	9	4	
			normal	0	7	11	28	19	3	
	estadio									
		1	2	3	4					
	cáncer	11	13	11	8	43				

Total 311 personas

*Las distribuciones de sexo y edad de personas sanas normales y pacientes con cáncer de estómago que se ofrecieron voluntarios para el análisis de datos anteriores se presentaron según el grupo de entrenamiento (A, 200 personas) y el grupo de evaluación (B, 111 personas).

<3-1> Selección de proteína marcadora mediante SVM/GA

Para examinar proteínas marcadoras que faciliten la distinción del grupo de cáncer de estómago del grupo sano normal, se vincularon datos de proteoma de 100 pacientes con cáncer de estómago y 100 personas sanas normales con la máquina de vectores de soporte (V. N. Vapnik *et. al.*, Theory of Support Vector Machines, Technical Report CSD-TR-96-17, Univ. de Londres, 1996.) y algoritmo genético seguido por entrenamiento. Como resultado, se examinaron puntos óptimos (9) que serían marcadores para cáncer de estómago debido a su alto resultado de entrenamiento (sensibilidad: 91% y especificidad: 97%).

<3-2> Prueba de la t

Se realizó la prueba de la t para determinar si la diferencia de expresión de la proteína marcadora para diagnosticar cáncer de estómago examinada en el ejemplo anterior entre personas sanas normales y pacientes con cáncer de estómago era suficientemente significativa como para determinar la proteína como marcador. En particular, se compararon los valores medios de expresiones entre pacientes con cáncer de estómago y personas sanas normales mediante el uso del programa SAS (Statistical Analysis System Institute Inc.) y se obtuvieron los valores de p. Cuando $p < 0,05$, se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa. Tal como se muestra en la tabla 3, la prueba de la t confirmó que se habían examinado 9 puntos sugiriendo que eran las proteínas que muestran diferencias significativas en los niveles de expresión entre personas sanas normales y pacientes con cáncer de estómago.

[Tabla 3]

Proteína marcadora	LRG	Clusterina	Alfa-1- antitripsina	Apolipoproteína A-IV	Transtiretina
Prueba de la t	1,32 E-07	4,24 E-02	3,12 E-05	3,82 E-05	6,41 E-07
	Proapolipoproteína A-I	Haptoglobina beta	Haptoglobina alfa-2	Apolipoproteína H	
	3,85 E-08	1,16 E-07	3,85 E-14	3,32 E-04	

<3-3> Diagnóstico mediante bosque aleatorio

Las candidatas de proteína marcadora para diagnosticar cáncer de estómago, examinados mediante SVM/GA en el ejemplo anterior, se aplicaron a bosque aleatorio (los resultados de múltiples determinantes de tres clasificaciones se integraron según la regla de la mayoría, que sería el resultado clasificado final, L. Breiman, "Random forests", Machine Learning, Vol. 45. Número 1, octubre de 2001), otro algoritmo de bioinformática. El resultado fue coherente con el obtenido mediante el análisis de SVM/GA anterior, es decir, el grupo de entrenamiento igual de 200 personas también mostró alto índice de decisión del 80,0% (sensibilidad del 78% y especificidad del 82%).

<3-4> Validación cruzada

Para investigar errores del grupo de entrenamiento seleccionado al azar, se realizó validación cruzada mediante validación dejando uno fuera (un método para suponer errores generalizados, en el que se dividieron los datos en subconjuntos k del mismo tamaño y se determinó que grupos $k-1$ eran un grupo de entrenamiento y se determinó que el restante era un grupo de evaluación y este experimento de clasificación se realizó k veces y se calculó el error promedio según k veces). Como resultado, el índice de decisión fue del 81,5% (sensibilidad del 78% y especificidad del 85%).

<3-5> Identificación de las proteínas seleccionadas

Se recogió cada mancha en el gel de electroforesis bidimensional y se colocó en un tubo que contenía agua destilada, seguido por digestión con tripsina en gel, dando como resultado péptidos. Los péptidos se sometieron a prueba en el Instituto de Ciencias Básicas de Corea, Taejeon, Corea. Se analizaron las proteínas mediante MALDI-TOF-TOF (ABI 4700 Proteomics Analyzer) y se examinaron los espectros mediante huella de masa peptídica y el programa MS/MS ion search a partir de la base de datos para identificar las proteínas (Michael O. Glocker *et al.*, Proteomics, 4: 3921-3032, 2004).

<3-6> Verificación de las proteínas seleccionadas

Para confirmar la competencia de los candidatos de proteína marcadora seleccionados para diagnosticar cáncer de estómago para distinguir muestras de cáncer de normales, se realizó bosque aleatorio esta vez sin el proteoma del grupo de entrenamiento sino con el proteoma del grupo de evaluación (111 personas que no se incluyeron en el grupo de entrenamiento; 43 pacientes con cáncer de estómago, 68 personas sanas normales). A partir del resultado del algoritmo de la máquina de vectores de soporte se confirmó que los candidatos de proteína marcadora tenían una sensibilidad del 81,39% y una especificidad del 77,94%. El algoritmo de bosque aleatorio dio el resultado de que los candidatos de proteína marcadora tuvieran una sensibilidad del 86,05% y una especificidad del 82,35%. Dos algoritmos diferentes demostraron de manera coherente que los candidatos tenían una alta sensibilidad de aproximadamente el 80%, lo que sugiere que estos candidatos son muy útiles como proteínas marcadoras.

Ejemplo 4: Verificación de proteínas marcadoras para diagnosticar cáncer de estómago - inmunotransferencia

Para investigar los niveles de expresión de proteínas marcadoras para diagnosticar cáncer de estómago en sueros normales y en sueros de pacientes con cáncer de estómago, se prepararon muestras agrupadas de suero de 50 personas de cada grupo: personas sanas normales y pacientes con cáncer de estómago, seguido por inmunotransferencia usando un anticuerpo contra cada proteína. Como resultado, tal como se muestra en la figura 4, los niveles de proteína marcadora en los sueros de pacientes con cáncer de estómago estaban aumentados o reducidos, en comparación con los de los sueros normales (figura 4).

1) Alfa-1-antitripsina

Se diluyó suero humano con agua destilada y tampón de muestra 5x (0,0016 ul de suero/1 ul de muestra), que se cargó en SDS-PAGE al 12% a diferentes volúmenes de 1, 2, 4 y 6 ul. Se cargaron 48 ng de alfa-1-antitripsina (Sigma) como control positivo, seguido por electroforesis con 25 mA. Se realizó inmunotransferencia de tipo Western. En particular, se transfirió el gel sobre una membrana de PVDF, seguido por bloqueo con el 5% de leche desnatada/PBST (Tween 20 al 0,05%). Se trató la membrana con anticuerpo frente a alfa-1-antitripsina (IgY de pollo, Abcam) diluido (1:10000) en el 5% de leche desnatada/PBST (tratamiento primario) y anticuerpo anti-IgY de pollo-HRP (1:20000, Abcam) (tratamiento secundario).

2) Haptoglobina alfa

Se diluyó suero humano (0,04 ul de suero/1 ul de muestra), que se cargó en SDS-PAGE. Se cargaron His-Hp $\alpha 2$ purificada y 50 ng de haptoglobina (Sigma) como control positivo. Se trató con anticuerpo policlonal anti-haptoglobina alfa (1:1000) como anticuerpo primario y con anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP (1:20000, Sigma) como anticuerpo secundario. Se preparó el anticuerpo policlonal anti-haptoglobina alfa usado como anticuerpo primario inyectando his-haptoglobina alfa 2 recombinante en un conejo, que facilitó el Centro Médico Asan, Seúl, Corea. (his-Hp: proteína de fusión recombinante marcada con histidina de haptoglobina)

3) Haptoglobina beta

Se diluyó suero humano (0,04 ul de suero/1 ul de muestra), que se cargó en SDS-PAGE. Se trató con anticuerpo policlonal anti-haptoglobina (1:5000, Sigma) como anticuerpo primario y con anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (1:20000, Sigma) como anticuerpo secundario.

4) Transtiretina

Se diluyó suero humano (0,0016 ul de suero/1 ul de muestra), que se cargó en SDS-PAGE. Se trató con anticuerpo policlonal anti-transtiretina (1:1000, Dakocytomation, Inc.) como anticuerpo primario y con anticuerpo anti-IgG de conejo-HRP (1:20000, Sigma) como anticuerpo secundario.

5) Proapolipoproteína A-I

La proapolipoproteína A-I es el precursor de la apolipoproteína A-I en la que se han retirado 7 aminoácidos en el extremo N-terminal. No pudo obtenerse ni construirse un anticuerpo que pudiera distinguir proapolipoproteína A-1 de apolipoproteína A-1, y por tanto fue imposible de detectar mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 5: Expresión de la proteína marcadora seleccionada según el estadio de cáncer

Se dividieron 143 pacientes con cáncer de estómago totales (grupo de entrenamiento-100, grupo de evaluación-43) por el estadio (1-4) y se investigaron las expresiones de 9 proteínas marcadoras según el estadio. En particular, los

datos de los pacientes con cáncer de estómago se dividieron en 4 grupos según el estadio (estadio 1-53, estadio 2-36, estadio 3-34 y estadio 4-20). Se calculó el valor medio de las expresiones de estas 9 proteínas para cada grupo, lo que se dividió entre el valor medio de las expresiones de estas 9 proteínas en las 168 personas sanas normales (figura 3). Un valor numérico resultante mayor de 1 indica que las expresiones de estas proteínas marcadoras están aumentadas en pacientes con cáncer de estómago, mientras que un valor numérico menor de 1 indica lo contrario. Como resultado, las expresiones de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG), clusterina, alfa-1-antitripsina, proapolipoproteína A-I, haptoglobina beta, haptoglobina alfa-2 y apolipoproteína H aumentaban en pacientes con cáncer de estómago a medida que el cáncer progresaba. Mientras, las expresiones de apolipoproteína A-IV y transtiretina se reducían en pacientes con cáncer de estómago a medida que el cáncer progresaba. Es decir, las expresiones de estas 9 proteínas marcadoras difieren entre normal y cáncer de estómago y según el estadio, lo que indica que estos marcadores muestran patrones de expresión característicos, aumentan o disminuyen según el estadio de cáncer. En conclusión, los marcadores para diagnosticar cáncer de estómago examinados anteriormente muestran diferentes patrones de expresión entre estado normal y de cáncer de estómago y según el estadio de cáncer.

[Aplicabilidad industrial]

Las proteínas marcadoras para diagnosticar cáncer de estómago de la presente invención y un kit de diagnóstico que usa las mismas facilitan el diagnóstico temprano de cáncer de estómago comprobando simplemente sus expresiones en líquido corporal y facilitan de ese modo una rápida respuesta para el tratamiento. Por tanto, se espera que las proteínas marcadoras puedan contribuir a la mejora de la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de estómago desarrollado aproximadamente en al menos 20.000 pacientes/año y a reducir los costes de la atención sanitaria nacional por el tratamiento del cáncer.

[Texto de lista de secuencias]

SEQ. ID. NO: 1 es la secuencia polipeptídica de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG).

SEQ. ID. NO: 2 es la secuencia polipeptídica de clusterina.

SEQ. ID. NO: 3 es la secuencia polipeptídica de alfa-1-antitripsina.

SEQ. ID. NO: 4 es la secuencia polipeptídica de apolipoproteína A-IV.

SEQ. ID. NO: 5 es la secuencia polipeptídica de transtiretina (prealbúmina).

SEQ. ID. NO: 6 es la secuencia polipeptídica de proapolipoproteína A-I.

SEQ. ID. NO: 7 es la secuencia polipeptídica de haptoglobina beta.

SEQ. ID. NO: 8 es la secuencia polipeptídica de haptoglobina alfa-2.

SEQ. ID. NO: 9 es la secuencia polipeptídica de apolipoproteína H.

<110> bio-infra

<120> Marcadores proteicos para diagnosticar cáncer de estómago y kit de diagnóstico que usa los mismos

<130> 6fpo-11-33

<150> Documento KR2006-19517

<151> 28-02-2006

<160> 9

<170> KopatentIn 1,71

<210> 1

<211> 312

<212> PRT

<213> Alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG)

<400> 1

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

ES 2 623 986 T3

225					230						235					240
Pro	Glu	Gly	Leu	Trp	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Pro	Asn	Trp	Asp	Met	Arg	
				245					250					255		
Asp	Gly	Phe	Asp	Ile	Ser	Gly	Asn	Pro	Trp	Ile	Cys	Asp	Gln	Asn	Leu	
			260					265					270			
Ser	Asp	Leu	Tyr	Arg	Trp	Leu	Gln	Ala	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Phe	Ser	
		275					280					285				
Gln	Asn	Asp	Thr	Arg	Cys	Ala	Gly	Pro	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Gln	Thr	
		290				295					300					
Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Lys	Ser	Gln									
305					310											

<210> 2
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Clusterina
 <400> 2

5

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

Pro	Phe	Ser	Pro	Tyr	Glu	Pro	Leu	Asn	Phe	His	Ala	Met	Phe	Gln	Pro
	210					215					220				
Phe	Leu	Glu	Met	Ile	His	Glu	Ala	Gln	Gln	Ala	Met	Asp	Ile	His	Phe
225					230					235					240
His	Ser	Pro	Ala	Phe	Gln	His	Pro	Pro	Thr	Glu	Phe	Ile	Arg	Glu	Gly
				245					250					255	
Asp	Asp	Asp	Arg	Thr	Val	Cys	Arg	Glu	Ile	Arg	His	Asn	Ser	Thr	Gly
			260					265					270		
Cys	Leu	Arg	Met	Lys	Asp	Gln	Cys	Asp	Lys	Cys	Arg	Glu	Ile	Leu	Ser
		275					280					285			
Val	Asp	Cys	Ser	Thr	Asn	Asn	Pro	Ser	Gln	Ala	Lys	Leu	Arg	Arg	Glu
	290					295					300				
Leu	Asp	Glu	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Arg	Lys	Tyr	Asn
305					310					315					320
Glu	Leu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Gln	Trp	Lys	Met	Leu	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu
				325					330					335	
Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Glu	Gln	Phe	Asn	Trp	Val	Ser	Arg	Leu	Ala	Asn
			340					345					350		
Leu	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Val	Thr	Thr	Val	Ala
		355					360					365			
Ser	His	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Val	Pro	Ser	Gly	Val	Thr	Glu	Val	Val
	370					375					380				
Val	Lys	Leu	Phe	Asp	Ser	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Val	Glu
385					390					395					400
Val	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Phe	Met	Glu	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Ala
				405					410					415	
Leu	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Lys	His	Arg	Glu	Glu					
			420					425							

<210> 3

<211> 394

<212> PRT

<213> Alfa-1-antitripsina

<400> 3

ES 2 623 986 T3

Glu	Asp	Pro	Gln	Gly	Asp	Ala	Ala	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Ser	His	His
1				5					10					15	
Asp	Gln	Asp	His	Pro	Thr	Phe	Asn	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Ala	Glu
			20					25					30		
Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ala	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Thr
		35					40					45			
Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu
	50					55					60				
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr	His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu
65					70					75					80

ES 2 623 986 T3

Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro	Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	
				85					90					95		
Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	
			100					105					110			
Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	
		115					120					125				
Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	
	130					135					140					
Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	
145					150					155					160	
Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	Ile	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	
				165					170					175		
Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Phe	Ala	Leu	Val	Asn	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Gly	
			180					185					190			
Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	
		195					200					205				
His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val	Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu	
	210					215					220					
Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys	Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Trp	Val	Leu	
225					230					235					240	
Leu	Met	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Asp	
				245					250					255		
Glu	Gly	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	Asn	Glu	Leu	Thr	His	Asp	Ile	Ile	
			260					265					270			
Thr	Lys	Phe	Leu	Glu	Asn	Glu	Asp	Arg	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	His	Leu	
		275					280					285				
Pro	Lys	Leu	Ser	Ile	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asp	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Gly	
	290					295					300					
Gln	Leu	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Phe	Ser	Asn	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Gly	
305					310					315					320	
Val	Thr	Glu	Glu	Ala	Pro	Leu	Lys	Leu	Ser	Lys	Ala	Val	His	Lys	Ala	
				325					330					335		
Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Met	Phe	
			340					345					350			
Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys	
		355					360					365				
Pro	Phe	Val	Phe	Leu	Met	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Pro	Leu	Phe	
	370					375					380					
Met	Gly	Lys	Val	Val	Asn	Pro	Thr	Gln	Lys							
385					390											

<210> 4
<211> 376
<212> PRT
5 <213> Apolipoproteína A-IV
<400> 4

Glu	Val	Ser	Ala	Asp	Gln	Val	Ala	Thr	Val	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	Ser	1	5	10	15
Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Glu	His	Leu	Gln	Lys	Ser	20	25	30	
Glu	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Gly	Glu	35	40	45	
Val	Asn	Thr	Tyr	Ala	Gly	Asp	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Val	Pro	Phe	Ala	50	55	60	
Thr	Glu	Leu	His	Glu	Arg	Leu	Ala	Lys	Asp	Ser	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	65	70	75	80
Glu	Ile	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Pro	His	85	90	95	
Ala	Asn	Glu	Val	Ser	Gln	Lys	Ile	Gly	Asp	Asn	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	100	105	110	
Gln	Arg	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Thr	Gln	Val	Asn	Thr	115	120	125	
Gln	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Gln	Leu	Thr	Pro	Tyr	Ala	Gln	Arg	Met	130	135	140	
Glu	Arg	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Ser	Leu	Arg	145	150	155	160
Pro	His	Ala	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Ile	Asp	Gln	Asn	Val	Glu	Glu	165	170	175	
Leu	Lys	Gly	Arg	Leu	Thr	Pro	Tyr	Ala	Asp	Glu	Phe	Lys	Val	Lys	Ile	180	185	190	
Asp	Gln	Thr	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ala	Gln	195	200	205	
Asp	Thr	Gln	Glu	Lys	Leu	Asn	His	Gln	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	210	215	220	
Met	Lys	Lys	Asn	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	Ile	Ser	Ala	Ser	Ala	225	230	235	240
Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Pro	Leu	Ala	Glu	Asp	Val	Arg	Gly	245	250	255	
Asn	Leu	Lys	Gly	Asn	Thr	Glu	Gly	Leu	Gln	Lys	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	260	265	270	
Gly	Gly	His	Leu	Asp	Gln	Gln	Val	Glu	Glu	Phe	Arg	Arg	Arg	Val	Glu	275	280	285	
Pro	Tyr	Gly	Glu	Asn	Phe	Asn	Lys	Ala	Leu	Val	Gln	Gln	Met	Glu	Gln	290	295	300	
Leu	Arg	Gln	Lys	Leu	Gly	Pro	His	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Gly	His	Leu				

305		310		315		320									
Ser	Phe	Leu	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Asp	Lys	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser
				325					330					335	
Thr	Phe	Lys	Glu	Lys	Glu	Ser	Gln	Asp	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu
			340					345					350		
Leu	Glu	Gln	Gln	Gln	Glu	Gln	Gln	Gln	Glu	Gln	Gln	Gln	Glu	Gln	Val
		355					360					365			
Gln	Met	Leu	Ala	Pro	Leu	Glu	Ser								
	370					375									

<210> 5

<211> 127

<212> PRT

<213> Transtiretina (prealbúmina)

<400> 5

Gly	Pro	Thr	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Met	Val	Lys	Val
1				5					10					15	
Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Asn	Val	Ala	Val	His	Val
			20					25					30		
Phe	Arg	Lys	Ala	Ala	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys
		35					40					45			
Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Glu	Phe
	50					55					60				
Val	Glu	Gly	Ile	Tyr	Lys	Val	Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Ser	Tyr	Trp	Lys
65					70				75						80
Ala	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Phe	His	Glu	His	Ala	Glu	Val	Val	Phe	Thr
				85					90					95	
Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser
			100					105					110		
Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ala	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Glu	
		115					120					125			

<210> 6

<211> 249

<212> PRT

<213> Proapolipoproteína A-I

<400> 6

Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp	Asp	Arg	1	5	10	15
Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	20	25	30	
Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys	Gln	Leu	35	40	45	
Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr	Phe	Ser	50	55	60	
Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp	Asp	Asn	65	70	75	80
Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys	Asp	Leu	85	90	95	
Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe	Gln	Lys	100	105	110	
Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Pro	Leu	115	120	125	
Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu	Leu	Gln	130	135	140	
Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	Ala	145	150	155	160
His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	165	170	175	
Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn	Gly	Gly	180	185	190	
Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu	Ser	Thr	195	200	205	
Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gly	Leu	210	215	220	
Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	225	230	235	240
Glu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	Gln								245			

5 <210> 7
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Haptoglobina beta

<400> 7

Ile	Leu	Gly	Gly	His	Leu	Asp	Ala	Lys	Gly	Ser	Phe	Pro	Trp	Gln	Ala		1		5		10					15	
Lys	Met	Val	Ser	His	His	Asn	Leu	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Leu	Ile	Asn			20		25				30			
Glu	Gln	Trp	Leu	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	Asn	His	Ser			35		40				45			
Glu	Asn	Ala	Thr	Ala	Lys	Asp	Ile	Ala	Pro	Thr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Val		50		55				60				
Gly	Lys	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Ile	Glu	Lys	Val	Val	Leu	His	Pro	Asn		65		70				75			80	
Tyr	Ser	Gln	Val	Asp	Ile	Gly	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Val	Ser			85		90					95		
Val	Asn	Glu	Arg	Val	Met	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Tyr	Ala			100		105				110			
Glu	Val	Gly	Arg	Val	Gly	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Asn	Ala	Asn			115		120				125			
Phe	Lys	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Tyr	Val	Met	Leu	Pro	Val	Ala	Asp		130		135				140				
Gln	Asp	Gln	Cys	Ile	Arg	His	Tyr	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Pro	Glu	Lys		145		150				155			160	
Lys	Thr	Pro	Lys	Ser	Pro	Val	Gly	Val	Gln	Pro	Ile	Leu	Asn	Glu	His			165		170					175		
Thr	Phe	Cys	Ala	Gly	Met	Ser	Lys	Tyr	Gln	Glu	Asp	Thr	Cys	Tyr	Gly			180		185				190			
Asp	Ala	Gly	Ser	Ala	Phe	Ala	Val	His	Asp	Leu	Glu	Glu	Asp	Thr	Trp			195		200				205			
Tyr	Ala	Thr	Gly	Ile	Leu	Ser	Phe	Asp	Lys	Ser	Cys	Ala	Val	Ala	Glu		210		215				220				
Tyr	Gly	Val	Tyr	Val	Lys	Val	Thr	Ser	Ile	Gln	Asp	Trp	Val	Gln	Lys		225		230				235			240	
Thr	Ile	Ala	Glu	Asn															245								

5

<210> 8

<211> 142

<212> PRT

ES 2 623 986 T3

<213> Haptoglobina alfa-2

<400> 8

Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly Cys Pro
1 5 10 15

Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr
20 25 30

Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr
35 40 45

Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys
50 55 60

Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro Lys Pro Pro Glu Ile
65 70 75 80

Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr
85 90 95

Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn Glu
100 105 110

Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu
115 120 125

5 Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln
 130 135 140

<210> 9

10 <211> 326

<212> PRT

<213> Apolipoproteína H

<400> 9

15

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val		
1				5					10					15			
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys		
			20					25					30				
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro		
		35					40					45					
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val		
	50					55					60						
Cys	Pro	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Val	Arg	Tyr	Thr	Thr		
65					70					75					80		
Phe	Glu	Tyr	Pro	Asn	Thr	Ile	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Thr	Gly	Phe	Tyr		
				85					90					95			
Leu	Asn	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Cys	Thr	Glu	Glu	Gly	Lys	Trp	Ser		
			100					105					110				
Pro	Glu	Leu	Pro	Val	Cys	Ala	Pro	Ile	Ile	Cys	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile		
		115					120					125					
Pro	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Val	Tyr	Lys	Pro	Ser	Ala	Gly	Asn	Asn		
	130					135					140						
Ser	Leu	Tyr	Arg	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	His	Ala		
145					150					155					160		
Met	Phe	Gly	Asn	Asp	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Thr	His	Gly	Asn	Trp	Thr		
				165					170					175			
Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Arg	Glu	Val	Lys	Cys	Pro	Phe	Pro	Ser	Arg	Pro		
			180					185					190				
Asp	Asn	Gly	Phe	Val	Asn	Tyr	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Lys		
		195					200					205					
Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Gly	Cys	His	Asp	Gly	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Pro		
	210					215					220						
Glu	Glu	Ile	Glu	Cys	Thr	Lys	Leu	Gly	Asn	Trp	Ser	Ala	Met	Pro	Ser		
225					230					235				240			
Cys	Lys	Ala	Ser	Cys	Lys	Val	Pro	Val	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Val	Tyr		
				245					250					255			
Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Lys	Ile	Gln	Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Gly	Met	Leu		
			260					265					270				
His	Gly	Asp	Lys	Val	Ser	Phe	Phe	Cys	Lys	Asn	Lys	Glu	Lys	Lys	Cys		

ES 2 623 986 T3

[illegible]

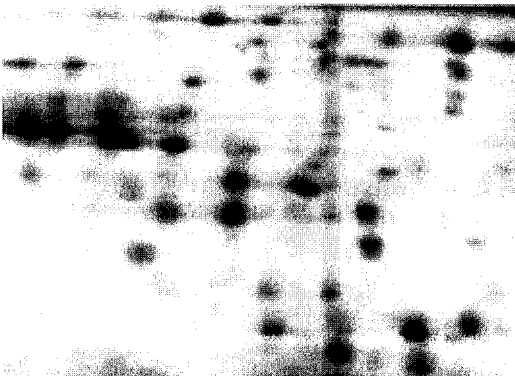
REIVINDICACIONES

1. Método de examen *in vitro* para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago que comprende las siguientes etapas:
 - (1) investigar el nivel de expresión de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG) en una muestra obtenida de un paciente;
 - (2) comparar el nivel de expresión de LRG en la muestra con el nivel de expresión de LRG de personas sanas normales; y
 - (3) considerar que el paciente pertenece al grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago si el nivel de expresión de LRG en la muestra está aumentado en comparación con el nivel de expresión de LRG de personas sanas normales.
2. Método de examen para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago según la reivindicación 1, en el que se investiga el nivel de expresión de LRG mediante electroforesis en gel bidimensional.
3. Método de examen para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago según la reivindicación 1, en el que las muestras se seleccionan de un grupo que consiste en sangre, suero y plasma sanguíneo.
4. Uso de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG) como marcador de diagnóstico *in vitro* para cáncer de estómago.
5. Uso de alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG) y/o un anticuerpo contra LRG en un método de examen *in vitro* para identificar un grupo de alto riesgo de padecer cáncer de estómago.

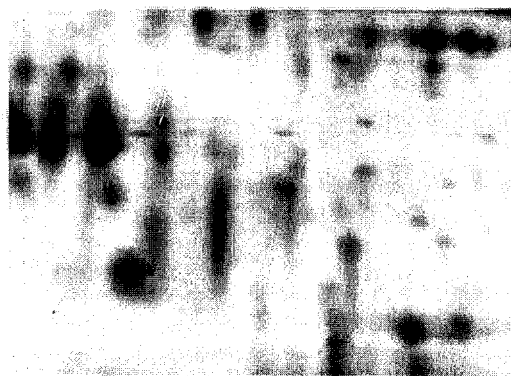
[Fig. 1]



1

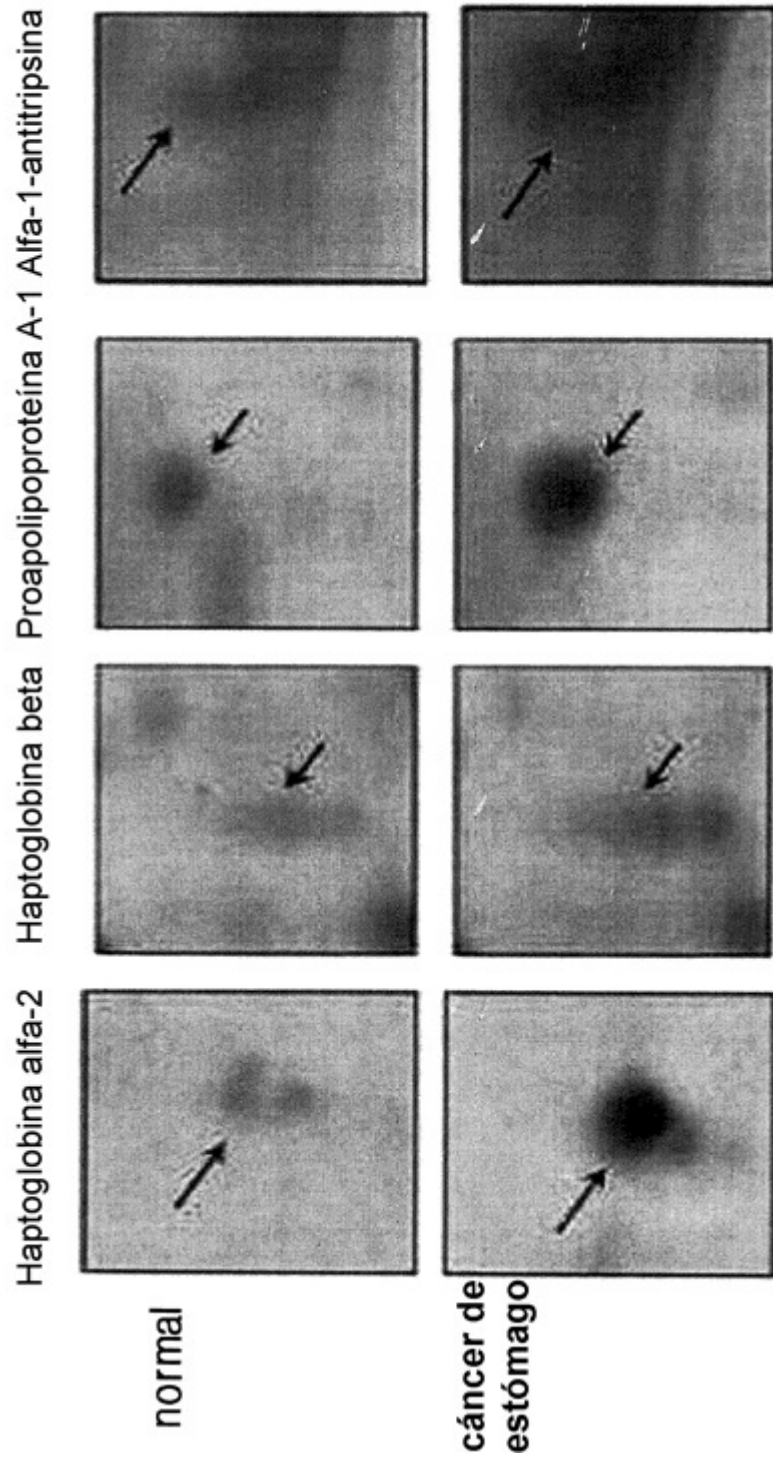


2

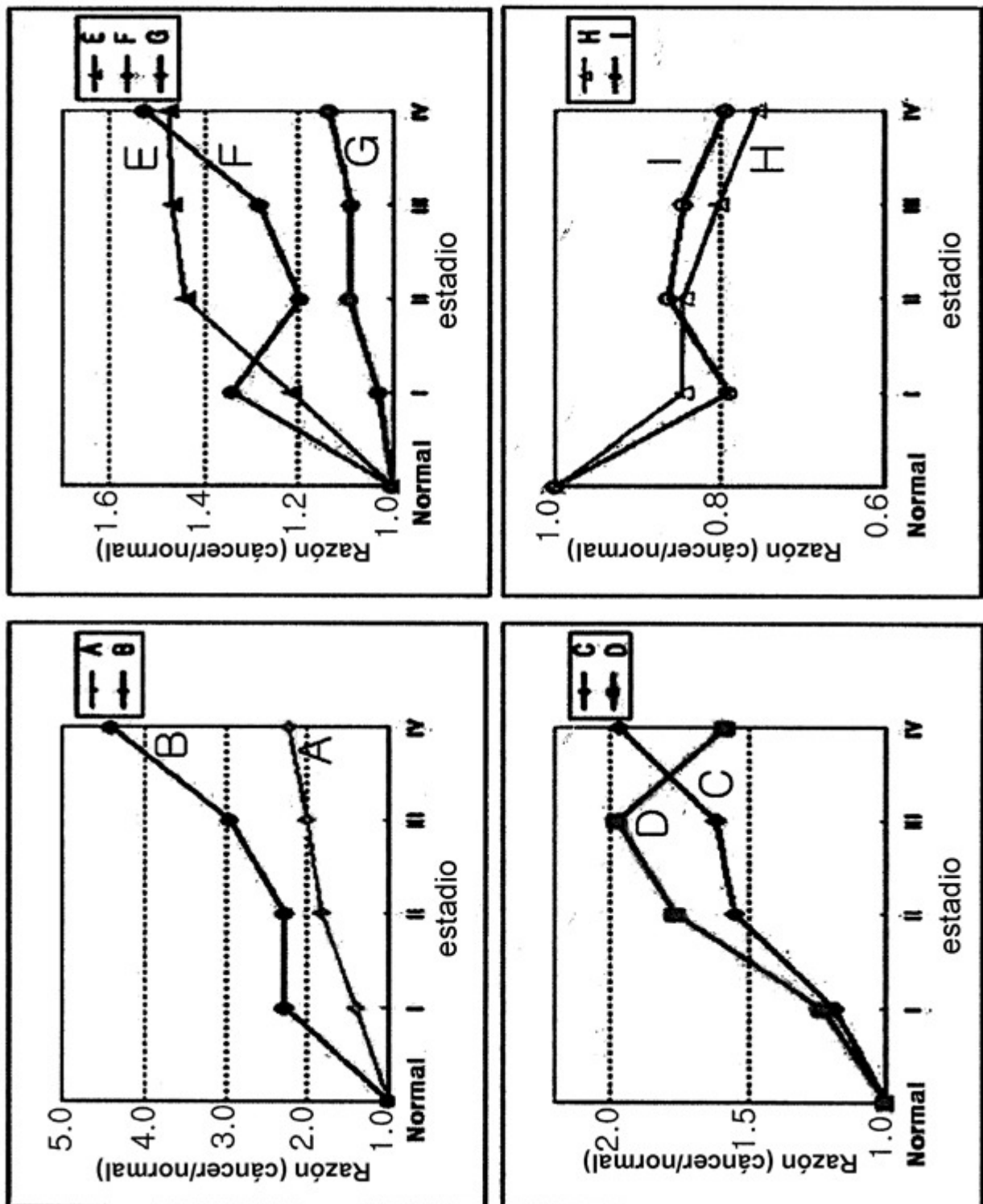


3

[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

