

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 261 049**

21 Número de solicitud: 200402989

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **16.12.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2006**

Fecha de la concesión: **03.10.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
Avda. Carlos III, nº 36 - 1º Dcha.
31003 Pamplona, Navarra, ES

72 Inventor/es: **Corrales Izquierdo, Fernando José;**
Fernández Irigoyen, Joaquín;
Santamaría Martínez, Enrique;
Muñoz Peralta, Javier;
Sesma Aguirre, Laura;
Prieto Valtueña, Jesús y
Ávila Zaragoza, Matías Antonio

74 Agente: **Ungría López, Javier**

54 Título: **Diagnóstico de carcinoma hepatocelular mediante la detección de formas oxidadas de apolipoproteína A1.**

57 Resumen:

Diagnóstico de carcinoma hepatocelular mediante la detección de formas oxidadas de apolipoproteína A1. Diagnóstico del carcinoma hepatocelular, mediante la detección del incremento de una isoforma ácida de la apolipoproteína A1 en muestras biológicas aisladas de los pacientes. Caracterizándose dicha isoforma por estar oxidada en los residuos W50 y W108.

ES 2 261 049 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de carcinoma hepatocelular mediante la detección de formas oxidadas de apolipoproteína A1.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se engloba dentro del campo del diagnóstico del carcinoma hepatocelular.

10 **Estado de la técnica anterior a la invención**

10 El carcinoma hepatocelular (HCC) es la quinta enfermedad neoplásica de mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer con más de 500.000 nuevos casos diagnosticados anualmente. A pesar de que las principales causas de HCC son conocidas, entre ellas, infección por virus de hepatitis B (HBV), o C (HVC), el consumo de alimentos contaminados con aflatoxina, o el consumo abusivo de alcohol, el pronóstico de los pacientes con HCC es malo
15 debido a la agresividad de la lesión en el momento de la diagnosis y a la falta de terapias eficaces. La identificación de biomarcadores que permitan describir con efectividad el estadio de esta enfermedad es, por lo tanto, de gran interés.

20 Existen evidencias de que muchos procesos patológicos se asocian con cambios cuantitativos y funcionales en los constituyentes moleculares de los fluidos corporales. Excluyendo los componentes celulares, el análisis comparativo de muestras de fluidos corporales de donantes sanos y enfermos sólo resulta posible a nivel proteómico y no a nivel transcripcional. A pesar de que el líquido cefalorraquídeo y la orina se utilizan en medicina diagnóstica, existe un creciente interés en el proteoma del suero humano debido a que el suero perfunde constantemente los tejidos y, por lo tanto, el comienzo o la presencia de una enfermedad podría determinarse midiendo y caracterizando las miles de
25 proteínas y péptidos circulantes individuales. Además, las técnicas de determinación en suero son técnicas incruentas, no invasivas, con buena disponibilidad de muestra, fáciles de realizar, rápidas y baratas.

30 Las técnicas tradicionales que permiten diagnosticar el HCC, como el incremento de los niveles de alfa fetoproteína (AFP), no son eficaces en todos los casos y resultan positivas cuando el estadio de la enfermedad es demasiado avanzado. Se han realizado estudios para identificar marcadores de HCC utilizando técnicas de proteómica de alto rendimiento, tanto en hígado (Zeindl-Eberhart E. *et al.* Hepatology (2004) 39:540-549), lo que supondría la utilización de técnicas invasivas para realizar el diagnóstico, como en suero (Steel F.L. *et al.* Proteomics (2003) 3:601-609; Quina Yu He *et al.* Proteomics (2003) 3:666-674). Sin embargo, si bien esta tecnología ha demostrado su eficacia en la detección de dianas moleculares relacionadas con el desarrollo de diversas enfermedades, su complejidad metodológica
35 hace impensable su utilización en la práctica clínica. Ninguno de los estudios mencionados presenta información que sirva como base para el desarrollo de metodologías diagnósticas aplicables en clínica. Por otra parte, diversos estudios, incluyendo los arriba mencionados, han relacionado una disminución en los niveles de Apo A1 con el desarrollo de enfermedades hepáticas. Sin embargo, la isoforma de Apo A1, y su aumento en suero de pacientes con carcinoma hepatocelular, objeto de esta invención no ha sido descrita previamente.

40 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, mediante la detección en una muestra biológica, preferentemente suero, de un incremento de una isoforma ácida de la apolipoproteína A1. Concretamente, una isoforma de apolipoproteína A1 oxidada en los residuos W50 y W108.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, caracterizado porque comprende detectar el incremento de isoformas de apolipoproteína A1 oxidadas en al menos un residuo triptófano o metionina, o fragmentos de las mismas que contengan dichos residuos oxidados. En una realización preferente de la invención, comprende la detección del incremento de al menos una isoforma de apolipoproteína A1 oxidada en al menos un residuo seleccionado entre W50, W108, y M112 o fragmentos de la misma que contengan dichos residuos. Los residuos W50 y W108 pueden estar oxidados a kinurenina, formilkinurenina, hidroxitriptófano, o 3-OH-kinurenina. Por otra parte, el residuo M112 puede estar oxidado a M112 sulfóxido, o metionina sulfona.
55

Además, el procedimiento objeto de la presente invención se caracteriza porque dicha detección se realiza en muestras biológicas aisladas. Estando dichas muestras seleccionadas entre: suero, plasma, sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, lágrima, líquido amniótico, lavado tisular, homogeneizado tisular, y lisado celular. En una realización preferente de la invención dicha muestra biológica es suero.

En una realización concreta de la presente invención, el diagnóstico de carcinoma hepatocelular se lleva a cabo en individuos con hepatitis, y preferentemente en individuos con hepatitis B (HBV).

65 Tal y como se utiliza en la invención, el término "individuo" se refiere a cualquier animal, preferentemente un mamífero. En una realización preferida de la invención, el individuo es un hombre o una mujer.

ES 2 261 049 B1

En el procedimiento objeto de la presente invención la detección de dicho incremento puede realizarse por comparación con estándares de Apo A1 purificada en cantidades conocidas, o mediante comparación con las cantidades de dicha isoforma presente en el mismo tipo de muestra biológica obtenida de individuos control sanos.

5 En una realización preferente, el incremento observado mediante dicho procedimiento, en la forma oxidada en el suero con respecto al nivel control es de al menos 1,5 veces, y preferentemente de al menos 2,5 veces.

Adicionalmente, dicho procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular, se caracteriza porque comprende el uso de métodos para detectar y cuantificar la presencia de isoformas oxidadas de Apo A1 seleccionados
10 entre: espectrometría de masas, inmunoensayos, ensayos químicos, cromatografía líquida, métodos fotométricos directos e indirectos, y combinaciones de los anteriores. En una realización preferente los métodos de espectrometría de masas están seleccionados entre: espectrometría de masas en tandem asociada con cromatografía líquida (LC-MS) y MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry time-of-flight MS*). Además, en una
15 realización preferente de la invención los inmunoensayos están seleccionados entre: ensayos homogéneos, ensayos heterogéneos, enzima-inmunoensayos (EIA, ELISA), ensayos de competición, ensayos inmunométricos (sandwich), ensayos turbidimétricos, ensayos nefelométricos y combinaciones de los anteriores; los cuales están extensamente descritos en "The immunoassay handbook" editado por David Wild, 2ª Edición 2001, Nature Publishing Group, el cual se incluye como referencia. En una realización preferida, los métodos de detección y cuantificación de formas oxidadas de Apo A1 comprenden la utilización de anticuerpos, aptámeros y/o lecitinas que reconocen específicamente
20 dichas isoformas de Apo A1 y fragmentos de las mismas.

El objeto de la presente invención, se refiere además, al diagnóstico precoz del carcinoma hepatocelular, por el procedimiento descrito anteriormente en el texto.

25 Además, la presente invención se refiere a un kit para determinar el incremento de isoformas de la apolipoproteína anteriormente descritas, caracterizado porque comprende reactivos para realizar los métodos de la presente invención. En una realización preferente, dichos reactivos están seleccionados entre ligandos específicos de isoformas de Apo A1, componentes marcadores para detectar isoformas de Apo A1, tampones, diluyentes, estándares y controles. En una realización preferida, dicho kit comprende además, botellas, viales, tubos agujas, sustratos sólidos e instrucciones.
30 nes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

35 Identificación del incremento de niveles de Apo A1 y Apo AIV en el suero de ratones *MAT1A*-/. Muestras de suero de ratones control y *MAT1A*-/ de 1, 3, 5, 12, y 18 meses de edad, fueron analizadas mediante electroforesis bidimensional. El panel A muestra geles representativos de tres análisis independientes. Las bandas diferenciales están identificadas en las áreas 1 y 2. El panel B muestra el espectro típico obtenido mediante MALDI TOF MS a partir de digestiones tríplicas de las bandas 1 y 2. Los péptidos cuya secuencia coincide con la secuencia de Apo AIV (1) y Apo A1 (2) están indicados.
40

Figura 2

45 Identificación de residuos específicos de metionina, sulfóxido en la isoforma 1 de Apo A1 mediante ESI-MS/MS. Los péptidos trípticos de las especies de Apo A1 fueron resueltos mediante cromatografía líquida nanoflujo de fase reversa. La columna se conectó mediante una fuente de electroespray a un espectrómetro de masas en tándem. Se muestran los espectros de fragmentación de los péptidos procedentes de la isoforma 1, que contenían derivados de la metionina sulfóxido en las posiciones 85 y 116. Las modificaciones fueron confirmadas en tres experimentos
50 independientes. En todos los ensayos, las isoformas 2 y 3 mostraron los residuos M85 y M116 sin oxidar.

Figura 3

55 Análisis de isoformas de Apo A1 en enfermedades de hígado humano mediante electroforesis bidimensional. Las isoformas de Apo A1 fueron analizadas en suero de pacientes con las patologías hepáticas indicadas. En todos los grupos, las muestras de suero de 6 pacientes fueron analizadas con la única excepción de EHNA (esteatohepatitis no alcohólica) en la que se incluyeron 15 pacientes en el estudio. El panel A muestra secciones de geles 2D representativos que contienen cuatro especies de Apo A1. Las bandas de proteína fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI TOF y secuenciación de péptidos de *novo*. La densitometría de las bandas de Apo A1 de grupos que
60 mostraban una distribución distinta de las isoformas que los individuos control se muestra en el panel B. * y ** indican $p < 0,05$ frente a individuos control de acuerdo con el análisis mediante la t de Student.

Figura 4

65 Identificación de derivados específicos de metionina sulfóxido y formilkinurenina en la isoforma 1 de Apo A1 humana. Digestiones trípticas de isoformas de Apo A1 a partir de pacientes control y pacientes con HBV+HCC se resolvieron mediante cromatografía nano-LC. Los péptidos eluidos fueron caracterizados mediante espectrometría de masas en tandem (ESI/MS/MS). Se muestran los espectros de los péptidos con los iones específicos metionina

ES 2 261 049 B1

sulfóxido (M112) y formilkinurenina (W50 y W108). Las modificaciones fueron confirmadas en tres experimentos independientes y sólo fueron detectadas en la isoforma 1. Las isoformas 2, 3, y 4 mostraban residuos de metionina y triptófano no oxidados.

5 Ejemplo 1

En este estudio se utilizaron ratones *MAT1A*^{-/-}, caracterizados por una reducción crónica de la enzima AdoMet hepática, lo que induce el desarrollo espontáneo de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA/NASH) y hepatocarcinoma celular a los 18 meses de edad.

10 Se tomaron muestras de suero de ratones control y *MAT1A*^{-/-}, de 3, 5, 12 y 18 meses de edad, y a continuación se analizaron mediante electroforesis bidimensional (2DE) seguida de espectrometría de masas. De este modo, se obtuvo una resolución promedio de 500 proteínas, y se realizó una comparación diferencial mediante PDQUEST, en la que se aceptaban como diferencias, los incrementos o disminuciones de un mínimo de dos veces. Con este
15 criterio se obtuvieron sólo dos bandas proteicas pertenecientes a los sueros de ratones *MAT1A*^{-/-}, cuyo incremento resultaba consistente en todos los ensayos. Además, estas diferencias se observaban a partir de 3 meses de edad de los ratones.

El análisis mediante PMF permitió identificar estas dos bandas proteicas incrementadas como la apolipoproteína A1V y la apolipoproteína A1 (Figura 1). Puesto que la Apo A1 ha sido implicada previamente en enfermedades hepáticas, se basó este análisis en la caracterización molecular de la forma incrementada específicamente. Así, mediante la digestión trípica de las distintas isoformas de Apo A1, seguida de nanocromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas Q TOF Micro mediante una fuente de ionización electrospray (ESI/MS/MS). Los péptidos
20 secuenciados representan más del 40% de la secuencia de Apo A1 en las tres isoformas (Tabla 1). Se identificaron cuatro residuos de metionina oxidados a metionina sulfóxido. La oxidación de M169 y M218 era común a los tres isotipos de Apo A1, y por lo tanto, no se puede descartar un artefacto generado durante el análisis de las muestras. Sin embargo, los sulfóxidos de M85 y M216 sólo fueron identificados en la isoforma 1 (Figura 2). Esta especificidad confirmada en tres análisis independientes, sugiere la relevancia fisiológica de la oxidación selectiva de los residuos
25 M85 y M216.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 261 049 B1

TABLA 1

Análisis mediante LC/MS/MS de isoformas de Apo A1 de suero murino

5 Péptidos tripticos de las isoformas de Apo A-1 procedentes de suero *MATIA*-/- fueron resueltos mediante cromatografía líquida nanoflujo de fase reversa conectada a un espectrómetro de masas ESI/MS/MS. Las secuencias de los péptidos de Apo A-1 se dedujeron mediante análisis de síntesis de *novo*. Los residuos de metionina oxidados se encuentran en negrita.

10

	isoforma de ApoA1	péptidos secuenciados	péptidos oxidados	% secuenciado
15	Apo A-I_1	VKDFAVNYVDAV		44
		K		
		DFWDNLEK	QEMNKDLEEV	
		VQPYLDEFQK	K	
20		VAPLGAELQESA	TQLAPHSEQM	
		R	R	
		SNPTLNEYHTR	HSLMPMLETL	
	ARPALEDLR	K		
25	Apo A-I_2	VKDFAVNYVDAV		40
		K		
		DFWDNLEK		
		VQPYLDEFQK	TQLAPHSEQM	
30		VAPLGAELQESA	R	
		R	HSLMPMLETL	
		SNPTLNEYHTR	K	
	ARPALEDLR			
35	Apo A-I_3	VKDFAVNYVDAV		44
		K		
		DFWDNLEK		
		QEMNKDLEEVK	TQLAPHSEQM	
40		VQPYLDEFQK	R	
		VAPLGAELQESA	HSLMPMLETL	
		R	K	
	QKLQELQGR			
	SNPTLNEYHTR			
	ARPALEDLR			

50

Ejemplo 2

55 Se estudiaron los niveles y el estado postraduccional de Apo A1 en muestras de suero de pacientes afectados de distintas patologías hepáticas, incluyendo esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis alcohólica, HBV, HCV, y HCC. Se identificaron cuatro bandas como Apo A1 mediante PMF (Peptide Mass Fingerprint) y secuenciación peptídica de *novo* en todas las muestras y análisis mediante Western blot 2D. Mediante este estudio se detectaron alteraciones patología-específicas de la cantidad relativa de las isoformas de Apo A1. De modo que todas las muestras de suero procedentes de pacientes con HBV y HCC mostraron un incremento de 2,5 veces de la isoforma 1, con respecto a los controles (cantidad relativa $41,93 \pm 3,00\%$ frente a $18,23 \pm 1,08\%$ en individuos control) (Figura 3).

60

A continuación, se quiso analizar si el incremento de la isoforma ácida de Apo A1 era el resultado de un incremento del estado de oxidación de la proteína. Los productos de la digestión triptica de las isoformas de Apo A1 procedentes de tres pacientes diferentes con HBV+HCC fueron analizadas mediante nano cromatografía líquida (nano LC) acoplada a un espectrómetro de masas Q TOF Micro mediante una fuente de ionización electrospray (ESI/MS/MS). En la isoforma 1 se detectaron selectivamente tres oxidaciones específicas. La oxidación de la metionina 112 a metionina sulfóxido se evidenció mediante una desviación +16 Da de la masa molecular correspondiente al ión (Figura 4). Adicionalmente, los iones de los residuos de triptófano 50 y 108 mostraron la adición de 32 unidades

65

ES 2 261 049 B1

de masa, consistente con la formación de formilkinurenina mediante dos pasos consecutivos de oxidación. La M112 sulfóxido y la formilkinurenina en las posiciones 50 y 108 sólo se identificaron en la isoforma 1 (Tabla 2), mientras que la secuencia de los péptidos análogos de las isoformas 2, 3 y 4 mostraron los residuos de metionina y triptófano no oxidados. Estos datos fueron consistentes en los tres análisis independientes, lo que apoya la relevancia fisiológica de estas modificaciones.

TABLA 2

Análisis de isoformas de Apo A1 procedentes de suero humano mediante LC/MS/MS

Los péptidos trípticos de las isoformas de Apo A1 procedentes de suero humano se resolvieron mediante una columna de fase reversa C18, nano-flujo, conectada con un espectrómetro de masas Q TOF Micro (ESI/MS/MS). Las secuencias de los péptidos de Apo A1 fueron deducidas a partir de sus espectros de fragmentación. Los residuos de metionina y triptófano oxidados se encuentran en **negrita**.

isoformas de ApoA1	Péptidos secuenciados	Péptidos oxidados	% secuenciado
Apo AI_1	VKDLATVYVDVLK		
	DLATVYVDVLK		
	DYVSQFEGSALGK		
	VQPYLDDFQK		
	THLAPYSDEL R		
	LEALKENGGAR	LLDNWDSVTSTFSK	51
	ATEHLSTLSEK	WQEEMEL YR	
	AKPALEDLAR		
	QGLLPVLESFK		
VSFLSALEEYTK			
Apo AI_2	VKDLATVYVDVLK		
	DYVSQFEGSALGK		
	LLDNWDSVTSTFSK		
	VQPYLDDFQK		
	WQEEMEL YR		
	LHELQEK		45
	LEALKENGGAR		
	ATEHLSTLSEK		
	AKPALEDLAR		
QGLLPVLESFK			
VSFLSALEEYTK			
Apo AI_3	DYVSQFEGSALGK		
	LLDNWDSVTSTFSK		
	VQPYLDDFQK		
	WQEEMEL YR		28
THLAPYSDEL R			
QGLLPVLESFK			
Apo AI_4	DYVSQFEGSALGK		
	LLDNWDSVTSTFSK		
	VQPYLDDFQK		24
	THLAPYSDEL R		
QGLLPVLESFK			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular **caracterizado** porque comprende detectar el incremento de isoformas de apolipoproteína A1 oxidadas en al menos un residuo triptófano o metionina, o fragmentos de las mismas que contengan al menos uno de dichos residuos oxidados.
- 10 2. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepático según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende la detección del incremento de al menos una isoforma de apolipoproteína A1 oxidada en al menos un residuo seleccionado entre W50, W108 y M112, o fragmentos de la misma que contengan al menos uno de dichos residuos oxidados.
- 15 3. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepático según la reivindicación 2 **caracterizado** porque comprende la detección del incremento de al menos una isoforma de apolipoproteína A1 oxidada en una combinación cualquiera de los residuos W50, W108 y M112, bien sean dos de ellos o los tres.
- 20 4. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los residuos W50 y W108 están oxidados a kinurenina, formilkinurenina, hidroxitriptofano, o 3-OH-kinurenina.
- 25 5. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque M112 está oxidado a M112 sulfóxido, o metionina sulfona.
- 30 6. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicha detección se realiza en una muestra biológica aislada.
- 35 7. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque dicha muestra biológica está seleccionada entre: suero, plasma, sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, lágrima, líquido amniótico, lavado tisular, homogeneizado tisular, y lisado celular.
- 40 8. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la muestra biológica es suero.
- 45 9. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque comprende el diagnóstico en muestras biológicas procedentes de individuos con hepatitis.
- 50 10. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según la reivindicación 9, **caracterizado** porque comprende el diagnóstico en muestras biológicas procedentes de individuos con HBV.
- 55 11. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque dicha detección se realiza por comparación con estándares de Apo A1 purificada en cantidades conocidas, o por comparación con las cantidades de dicha isoforma presente en el mismo tipo de muestras biológicas aisladas de controles sanos.
- 60 12. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque el incremento detectado de la isoforma oxidada de Apo A1 es de al menos 1,5 veces, con respecto al nivel control.
- 65 13. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque el incremento observado en la isoforma oxidada con respecto al nivel control es de al menos 2,5 veces.
- 70 14. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** la presencia de isoformas oxidadas de Apo A1 se detecta y se cuantifica mediante un método seleccionado entre: espectrometría de masas, inmunoensayos, ensayos químicos, cromatografía líquida, métodos fotométricos directos e indirectos y combinaciones de los anteriores.
- 75 15. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según la reivindicación 14, **caracterizado** porque los métodos de espectrometría de masas están seleccionados entre: espectrometría de masas en tandem asociada con cromatografía líquida (LC-MS) y MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry time-of flight*).
- 80 16. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dichos inmunoensayos están seleccionados entre: ensayos homogéneos, ensayos heterogéneos, enzima-inmunoensayos (EIA, ELISA), ensayos de competición, ensayos inmunométricos (sandwich), ensayos turbidimétricos, ensayos nefelométricos y combinaciones de los anteriores.

ES 2 261 049 B1

17. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dichos ensayos comprenden la utilización de anticuerpos, aptámeros y/o lectinas, que reconocen específicamente dichas isoformas de Apo A1 o sus fragmentos.

5 18. Procedimiento para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque dicho diagnóstico es precoz.

10 19. Kit para determinar el aumento de la isoforma de apolipoproteína A1 según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque comprende medios para detectar y cuantificar la presencia de dicha isoforma, o fragmentos de la misma, en muestras biológicas.

20. Kit para determinar el aumento de la isoforma de apolipoproteína A1 según la reivindicación 19, **caracterizado** porque comprende reactivos para realizar el procedimiento de la presente invención.

15 21. Kit para determinar el aumento de la isoforma de apolipoproteína A1 según una cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, **caracterizado** porque dichos reactivos están seleccionados entre: ligandos específicos de isoformas de Apo A1, componentes marcadores para detectar isoformas de Apo A1, tampones, diluyentes, estándares y controles.

20 22. Kit para determinar el aumento de la isoforma de apolipoproteína A1 según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado** porque comprende además, botellas, viales, tubos, agujas, sustratos sólidos, e instrucciones.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

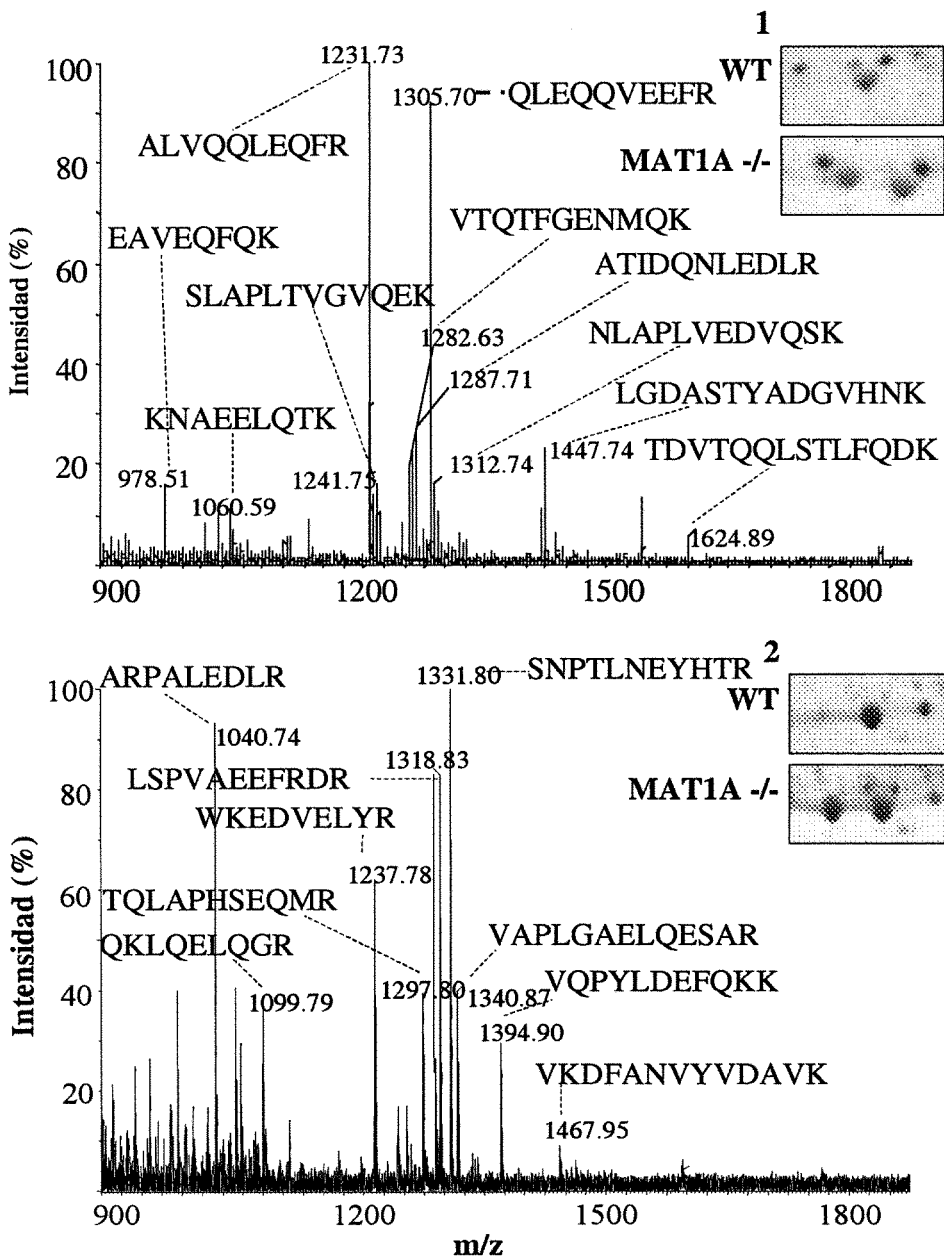
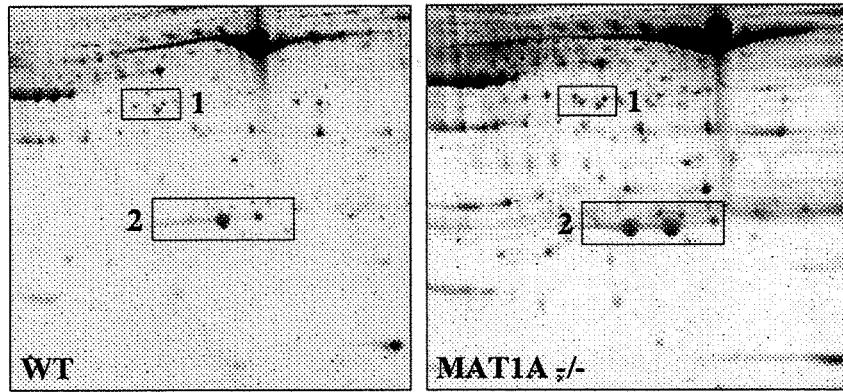


Figura 1

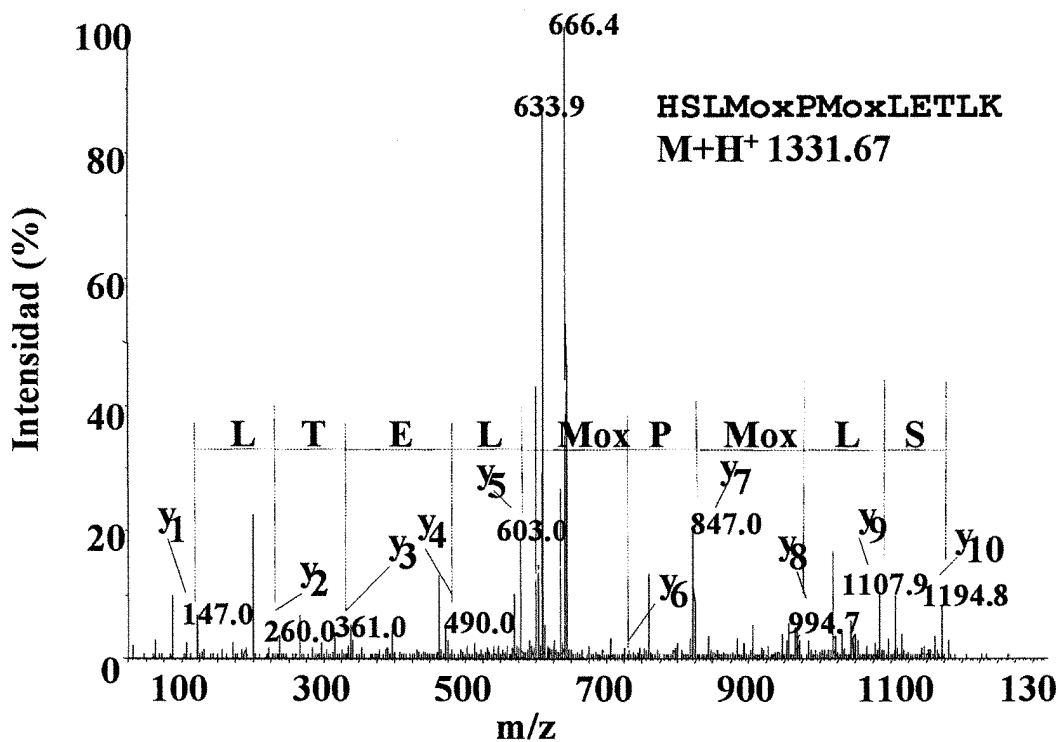
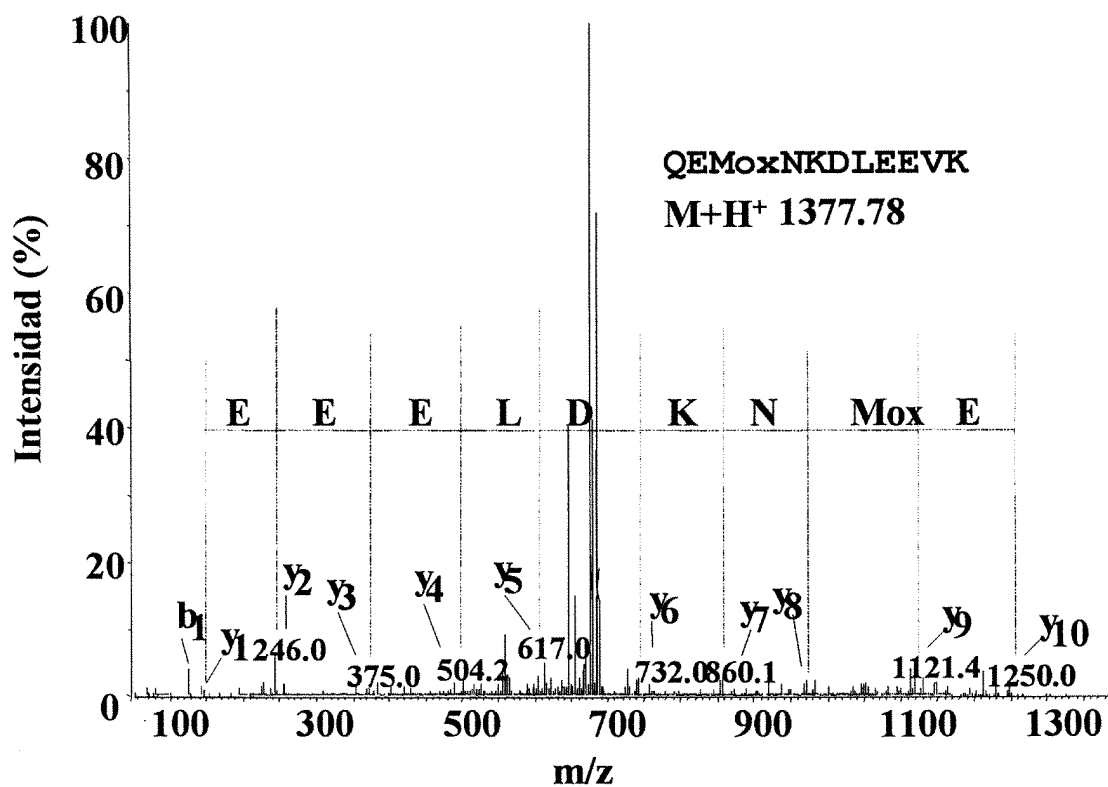


Figura 2

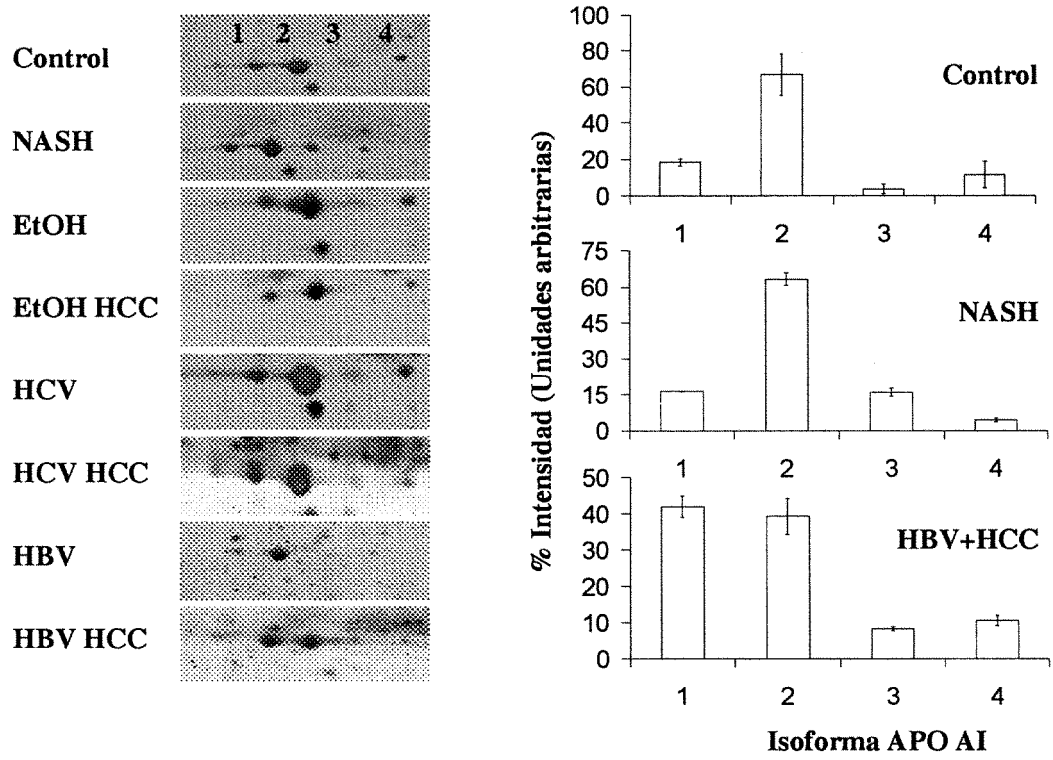


Figura 3

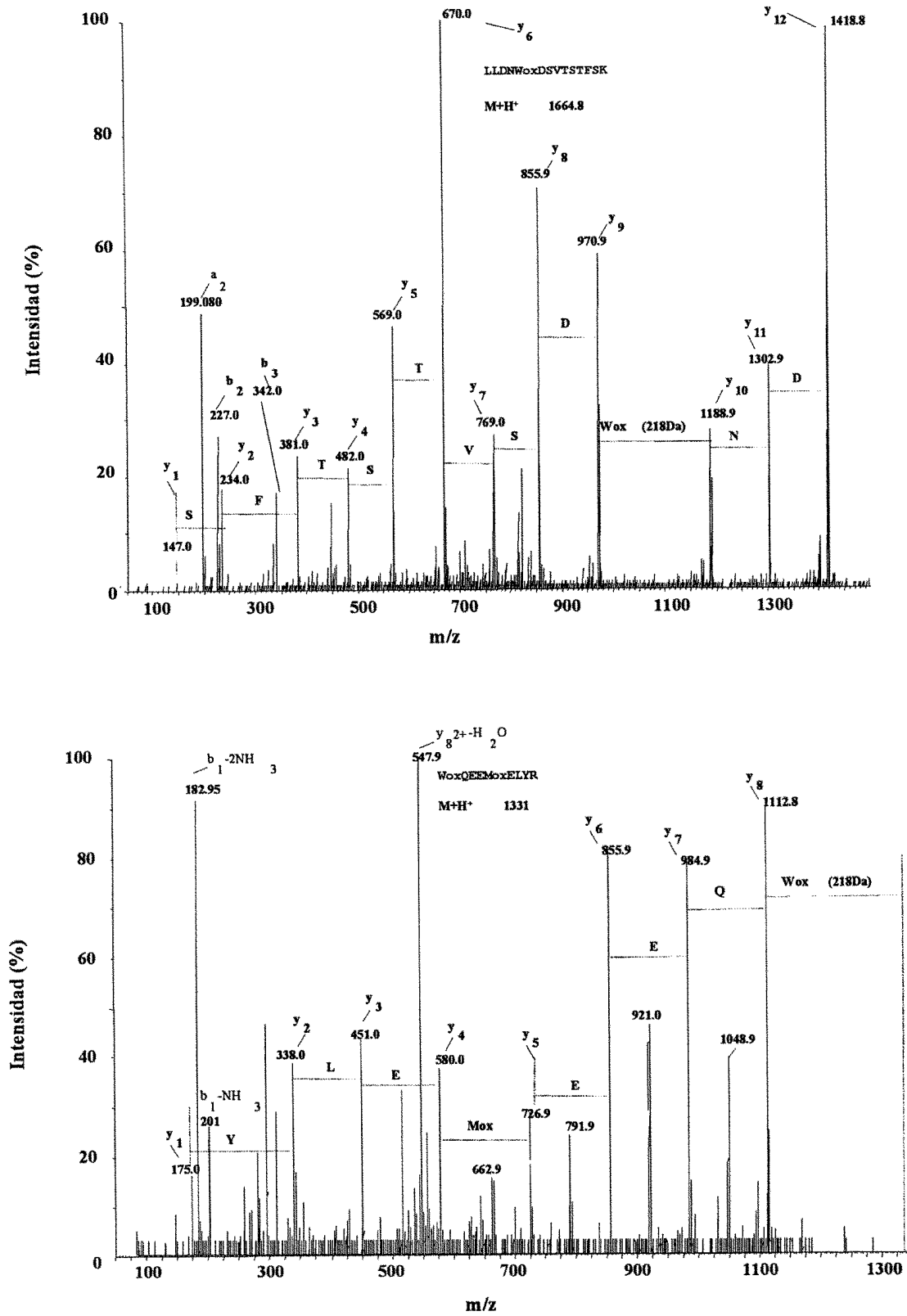


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 261 049

② Nº de solicitud: 200402989

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/574** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HE, Q.Y. et al. "Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study". PROTEOMICS. 2003. Vol. 3, páginas 666-674, todo el documento.	1-22
A	STEEL, L.F. et al. "A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma". PROTEOMICS. 2003. Vol. 3, páginas 601-609, todo el documento.	1-22
A	SIGALOV, A.B. et al. "Oxidation of methionine residues affects the structure and stability of apolipoprotein A-I in reconstituted high density lipoprotein particles". CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS. 2001. Vol. 113, páginas 133-146, todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 26.05.2005	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/1
---	--	----------------------