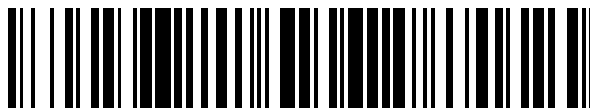


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 555**

21 Número de solicitud: 202430583

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.07.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.01.2025

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(60.00%)**

AVENIDA DE SÉNECA, 2

28040 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (40.00%)

72 Inventor/es:

CUBERO PALERO, Francisco Javier;

HIONIDES GUTIÉRREZ, Alejandro;

NEVZOROVA, Yulia A.;

SIMÓN DE BLAS, Clara y

FRANCO BENITO, Francisco José

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **MÉTODO *IN VITRO* Y KIT PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA Y/O EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER HEPÁTICO**

57 Resumen:

Método y kit para la detección temprana y/o pronóstico del cáncer de hígado.

La presente invención se refiere a un método de detección temprana y/o pronóstico del cáncer de hígado que se vale de una firma génica constituida por la expresión de 6 genes: MKI67, MMP13, LCN2, EMP1, CXLX1 y SAA2. El método incluye la determinación de la expresión de dichos genes en muestras aisladas de lesiones de hígado y la comparación de esa expresión con la de muestras aisladas de tejido sano.

La invención también se refiere a un kit que incluye cebadores para determinar la expresión de los genes que conforman la firma génica y que se describen en SEQ ID NO: 19-32.

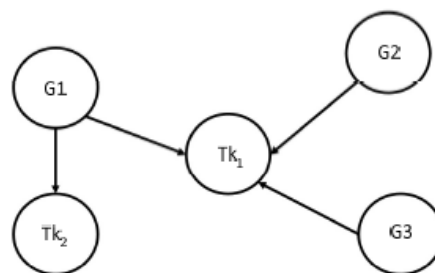


Fig. 1

ES 2 993 555 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO *IN VITRO* Y KIT PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA Y/O EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER HEPÁTICO

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología. Más concretamente se refiere a la detección de cáncer de hígado mediante la utilización de una firma génica.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un problema de salud mundial asociado con una alta incidencia, mal pronóstico y opciones de tratamiento limitadas, debido al diagnóstico tardío. Se trata del cáncer que con mayor frecuencia afecta al hígado y supone un problema grave de salud al ser el quinto tipo de cáncer más común en el ámbito mundial. La enfermedad se caracteriza por el fallo hepático y, en última instancia, conduce al fallecimiento del paciente.

20

A pesar de que la tasa global de fallecimientos como consecuencia del cáncer ha disminuido claramente desde 1991, la tasa de CHC sigue aumentando anualmente, llegando a más de 700.000 fallecimientos al año a nivel mundial. Este hecho está estrechamente relacionado con el diagnóstico tardío del CHC dado que la extirpación quirúrgica del tumor implica un pronóstico favorable, con una supervivencia a los cinco años del 70%, frente al 7% de supervivencia general en el caso del diagnóstico tardío.

25

Actualmente, la mayoría de los diagnósticos precoces de CHC se realizan mediante ecografía y pruebas serológicas. También se realizan diagnósticos mediante termografía computerizada o mediante imágenes por resonancia magnética, aunque la utilización de ambas técnicas no está muy extendida debido a su elevado coste.

30

En esta situación, se están desarrollando estudios de biomarcadores para el diagnóstico precoz de CHC basados, especialmente, en la expresión de distintos conjuntos de genes.

35

En este sentido, existen documentos de patente donde se describe la utilización de conjuntos de genes conductores de mutaciones que pueden identificarse mediante diferentes análisis para establecer una firma génica con la que detectar distintos tipos de tumores hepáticos.

La patente EP2307570B1 se refiere a un método para determinar el grado de un tumor hepático en una muestra previamente obtenida de un paciente, utilizando una firma molecular basada en la expresión de un conjunto de genes que puede incluir entre 2 y 16 genes, aunque se llega a describir la utilización de 100 genes y se prefiere la utilización de un conjunto de 16 genes.

En WO03061564A2 se describen los resultados del examen de tejido procedente de carcinoma hepático para identificar genes expresados de forma diferencial en el tejido hepático tumoral y en el tejido hepático enfermo, pero no tumoral. Se describen, también, algo más de 100 genes.

La solicitud de patente WO0229103A2 identifica los cambios globales en la expresión génica asociados al cáncer de hígado observados al examinar la expresión génica en tejido de hígado normal, hígado maligno metastásico y CHC e identifica perfiles de expresión que propone como marcadores de diagnóstico. Estos perfiles implican la expresión de un elevado número de genes.

En WO2011038763A1, se describe la identificación de cambios globales en la expresión génica asociados a enfermedades hepáticas que progresan a distintos tipos de cáncer. Como resultado de los perfiles de expresión que identifica, propone la utilización de una combinación de 30 oligómeros específicos o múltiples para secuencias de genes específicos para identificar y caracterizar lesiones del tejido hepático, entre ellas, el CHC.

Más recientemente, la solicitud WO2023066972A1 difunde un método de diagnóstico para detectar CHC basado en el análisis de tres estudios independientes de conjuntos de marcas epigenéticas (EWAS), en concreto de la metilación del ADN, y proponen el uso de una firma de metilación del ADN para diagnosticar CHC.

Por otro lado, en la revisión publicada por Siracusano, G. *et al. Vaccines* 2020, 8, 41, se presentan varios estudios centrados en el papel de las proteínas de la superficie celular (moléculas de adhesión celular, transportadores, mucinas, proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), entre otras) en la aparición y progresión del CHC y se defiende la posibilidad de utilizarlas como biomarcadores de la enfermedad y/o dianas para vacunas y terapias. Después de describir un elevado número de proteínas, la revisión concluye que la identificación de marcadores pronósticos y/o diagnósticos y de dianas para desarrollar terapias más eficaces sigue siendo una necesidad clínica insatisfecha.

Existe, por lo tanto, un elevado interés por encontrar una herramienta capaz de detectar el CHC de forma temprana. Se conoce un gran número de posibles biomarcadores que se han ensayado en distintos estudios, pero sigue siendo necesario encontrar una biomolécula, o un conjunto de biomoléculas, con las que detectar CHC de manera precoz y, a ser posible, económica para que pueda utilizarse ampliamente.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Método *in vitro* y kit para la detección temprana y/o el pronóstico del cáncer hepático.

El carcinoma hepatocelular (CHC) presenta una alta incidencia a nivel mundial, con un mal pronóstico y pocas opciones de tratamiento debido, fundamentalmente, al diagnóstico tardío. Por estos motivos, resulta de interés obtener herramientas para el pronóstico de cambios en la expresión de protooncogenes para el diagnóstico del CHC.

Con este objetivo, se ha realizado un análisis de red génica a partir de microarrays de ARN de más de 21.000 genes utilizando un modelo experimental de ratones con delección de NEMO específicamente en hepatocitos (NEMO^{Δhepa}) combinada con delecciones específicas en la señalización de receptores de muerte, incluyendo TRAIL (NEMO^{Δhepa}/TRAIL^{-/-}), TNFR1 (NEMO^{Δhepa}/TNFR1^{-/-}), y ratones NEMO^{Δhepa}/ TNFR1^{-/-}/TRAIL^{-/-} triple *knockout*. Los resultados obtenidos se han validado en animales con sobreexpresión transgénica de c-MYC en hepatocitos (c-MYC^{tg}) mediante qRT-PCR y se han analizado enfrentándolos a bases de datos de cáncer humano (TGCA). De esta

manera, hemos obtenido una firma génica constituida por 8 genes cuyas variaciones en cuanto a expresión parecían ser buenos indicadores del pronóstico de las lesiones hepáticas y del diagnóstico precoz de CHC. Sin embargo, al verificar la expresión de los genes de la firma génica en tejido tumoral y en varias cohortes de pacientes con CHC en distintos momentos de desarrollo de la enfermedad, utilizando la base de datos TCGA, hemos podido acotar el número de genes cuya expresión nos sirve para determinar la firma génica de detección precoz y pronóstico del CHC.

De esta manera se ha establecido una firma génica que consiste en la expresión de seis genes: MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 y SAA2.

Para detectar de forma temprana y/o pronosticar el desarrollo del cáncer hepático *in vitro*, a partir de muestras biológicas aisladas de un paciente con lesiones de hígado, un aspecto de esta invención se refiere a un método que comprende:

- a) determinar en la muestra biológica la expresión del conjunto de genes que consiste en MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 y SAA2;
- b) comparar la expresión del conjunto de genes del paso a) con la expresión de los mismos genes en muestras de referencia de tejido normal.

Para tener resultados fiables, la expresión del conjunto de genes del paso a) se normaliza con respecto a la expresión de un gen constitutivo que puede ser GAPDH, ACTB, HPRT o cualquier otro conocido por el experto en la materia.

La determinación de la expresión del conjunto de genes se puede realizar incluyendo una etapa de amplificación mediante qPCR, la detección del ADNc de cada gen, la detección del ARNm correspondiente a cada gen. Como cebadores para estas técnicas, una opción es utilizar las parejas de cebadores (*reverse* o R y *forward* o F) descritos en SEQ ID NO: 19-32. Así mismo, para determinar la expresión del gen constitutivo que se seleccione para la normalización de la expresión del conjunto de genes, se pueden utilizar las parejas de cebadores descritos en SEQ ID NO: 33-38.

La invención también se refiere a un método con el que se detecta y/o pronostica cáncer hepático en muestras obtenidas a partir de pacientes, cuando los genes MKI67, LCN2, MMP13 y EMP1 están sobreexpresados y los genes CXCL14 y SAA2 están infraexpresados en comparación con muestras control, es decir, muestras de

pacientes sanos o del mismo paciente pero obtenidas a partir de tejido sano.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección temprana y/o el pronóstico del cáncer hepático a partir de muestras biológicas aisladas de un paciente con lesiones de hígado que comprende un conjunto de cebadores que consiste en parejas de cebadores con los que se detecta la expresión de los 6 genes de la firma génica: MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 y SAA2. En concreto, estos cebadores pueden ser las parejas descritas en SEQ ID NO: 19-32. Además, el kit también puede incluir cebadores para la determinación de la expresión de un gen constitutivo, como puede ser cualquiera de los genes ACTB, GAPDH y/o HPRT, por ejemplo, el kit puede incluir cualquiera de las parejas de cebadores descritas en SEQ ID NO: 33-38.

En esta memoria descriptiva, se utilizan indistintamente las siguientes grafías para hacer referencia a los genes implicados en la invención: *Mki67* y MKI67, *Emp1* y EMP1, *Mmp13* y MMP13, *Lcn2* y LCN2, *Timp1* y TIMP1, *Cxcl14* y CXCL14, *Saa1* y SAA1, *Saa2* y SAA2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Gráfico de un gen. Se muestra la expresión de cada gen (G_1 , G_2 , G_3) con respecto a cada uno de los cuatro grupos de animales analizados (TK_1 , TK_2).

Figura 2. Diagrama de caja. Se presenta el diagrama de caja del nivel de expresión relativa de cada gen para cada uno de los cuatro grupos (GT_1 , GT_2 , GT_3 , GT_4).

Figura 3. Gráfico de la red de genes. Expresión de cada gen con respecto a cada grupo con su control. Grupo 1 (GT_1): NEMO vs NEMO^{ff}; Grupo 2 (GT_2): NEMO^{Δhepa}/TRAIL^{-/-} vs TRAIL^{-/-}; Grupo 3 (GT_3): NEMO^{Δhepa}/TNFR1^{-/-} vs TNFR1^{-/-}; Grupo 4 (GT_4): NEMO^{Δhepa}/TRAIL^{-/-}/TNFR1^{-/-} vs TRAIL^{-/-}/TNFR1^{-/-} (n=3).

Figura 4. Evaluación de la red de genes en modelos preclínicos de cáncer de hígado. Se muestran los resultados del análisis de la expresión de los genes *Mki67* (A), *Emp1* (B), *Mmp13* (C), *Lcn2* (D), *Timp1* (E), *Cxcl14* (F), *Saa2* (G) y *Saa1* (H) por qPCR en ratones NEMO^{Δhepa}, y sus controles, normalizados a la expresión de Gapdh (n= 6). La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA. Los valores p de significancia se indican como sigue: (*) P<0,05, (**) P<0,01, (***) P<0,001. FC: *Fold change*.

Figura 5. Evaluación de la red de genes en modelos preclínicos de cáncer de hígado. Se muestran los resultados del análisis de la expresión de los genes *Mki67* (A), *Emp1* (B), *Mmp13* (C), *Lcn2* (D), *Timp1* (E), *Cxcl14* (F), *Saa2* (G) y *Saa1* (H) por qPCR en ratones c-MYC^{tg}, y sus controles, normalizados a la expresión de Gapdh (n= 6). La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA. Los valores p de significancia se indican como sigue: (*) P<0,05, (**) P<0,01, (***) P<0,001. FC: *Fold change*.

Figura 6. Evaluación de la relevancia de la firma génica diagnóstica en tejido normal y tejido tumoral de pacientes con CHC en la base de datos TCGA y evaluación de la tasa de supervivencia general (SG). MKI67 (A), LCN2 (B), TIMP1 (C), SAA2 (D), SAA1 (E) y CXCL14 (F). La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA. Los valores p de significancia se indican como sigue: (*) P<0,05, (**) P<0,01, (***) P<0,001. N: tejido normal; TP tejido de tumor primario; TPM: transcritos por millón. Se muestra el efecto de la expresión de MK167 (G) y MMP13 (H) en la supervivencia de los pacientes con CHC. PS: probabilidad de supervivencia; d: tiempo en días; en rojo: nivel de expresión alto; en azul: nivel de expresión bajo/medio.

Figura 7. Evaluación de la relevancia de la firma génica pronóstica en tejido normal y tejido tumoral de pacientes con CHC en la base de datos TCGA. EMP1 (A) y MMP13 (B). N: tejido normal; TP tejido de tumor primario; TPM: transcritos por millón.

Figura 8. Tasa de SG. Se muestra el efecto de la expresión de los genes LCN2 (A), TIMP1 (B), CXCL14 (C) y SAA1 (D) en la supervivencia de los pacientes con CHC.

PS: probabilidad de supervivencia; d: tiempo en días; en rojo: nivel de expresión alto; en azul: nivel de expresión bajo/medio.

Figura 9. Evaluación de la expresión de la firma genética en tejido normal y tejido

- 5 **tumoral de pacientes.** (A) #Cohorte1. Expresión relativa de mRNA (mRNA) de LCN2, TIMP1, MMP13, MKI67, EMP1, SAA2 y CXCL14 en hígados de pacientes con CHC sometidos a resección quirúrgica o trasplante de hígado. Se incluyeron muestras ultracongeladas compuestas por tejido de CHC (Tumor) (n=24) y tejido adyacente no tumoral (NTAT) (n=24). (B) #Cohorte2. RNA-seq de la secuenciación con Illumina 'C'
- 10 de 50 muestras emparejadas normales y tumorales (GSE77314); se indica la normalización para ajustar al tamaño de las bibliotecas (TMM). (C) #Cohorte3. RNA-seq de 21 pares de tejidos hepáticos tumorales (Tumor) y no tumorales (Control) de pacientes con infección por virus de la hepatitis B y CHC (HBV-CHC) (GSE94660). (D) #Cohorte4. RNA-seq de 35 pares de tejidos tumorales y no tumorales de pacientes
- 15 con CHC (GSE124535).

Figura 10. Evaluación de la expresión de la firma genética en diferentes estadios

- de CHC.** (A) #Cohorte5. Microarray de 107 muestras que cubren múltiples estados de CHC e hígados normales como control (GSE89377). Hígados normales (C), hepatitis
- 20 crónica (1), cirrosis (2), nódulos displásicos (3), tumor temprano (4) y tumor avanzado (5). (B) #Cohorte6. RNA-seq de 86 pacientes que cubren múltiples estados de daño hepático. Hígados normales (C), hepatitis crónica (1), cirrosis (2), nódulos displásicos (3), tumor temprano (4) y tumor avanzado (5) (GSE114564).

25 **REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Modelos animales utilizados.

Se utilizaron modelos animales en ratón para analizar la progresión de la enfermedad hepática en ratones macho de 8-9 semanas y se estudió el CHC a las 52-54 semanas de edad. Para ello, se utilizó un modelo animal ya conocido, se trata de ratones con la

5 deleción del gen NEMO (*Nuclear-factor (NF)- κ B essential modulator*) específica de hepatocitos (NEMO ^{Δ hepa}); se caracterizan por desarrollar apoptosis espontánea en los hepatocitos, lo que se considera un mediador crítico de la progresión del CHC.

Además, esta deleción también se combinó con deleciones específicas en la

10 señalización de receptores de muerte:

- deleción de TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (NEMO ^{Δ hepa}/ TRAIL^{-/-}) para realizar un doble mutante más específico en señalización de muerte celular, al ser TRAIL un inductor de apoptosis en células tumorales, pero no de las células normales;

- 15 - deleción de TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) (NEMO ^{Δ hepa}/TNFR1^{-/-}), realizando así un modelo de doble deleción en señalizaciones de muerte celular, más específicamente en las señalizaciones por el *Tumor necrosis factor* (TNF), y

- triple deleción NEMO ^{Δ hepa}/TNFR1^{-/-}/TRAIL^{-/-} o triple *knockout*, realizando así una triple deleción para el testeo genético del CHC,

20 y se utilizaron los controles adecuados mediante retrocruzamiento, incluidos NEMO^{f/f} (flox/flox), TNFR1^{-/-}, TRAIL^{-/-} y TRAIL^{-/-}/TNFR1^{-/-}.

Por otro lado, se utilizaron ratones con sobreexpresión transgénica del protooncogen MYC, bajo el control de la albúmina específica de hepatocitos (c-MYC^{tg}), y hermanos

25 de camada de tipo silvestre (WT) como controles para validar los genes de interés.

Ejemplo 2. Análisis de micromatrices.

A las 52-54 semanas de edad, como se ha indicado en el ejemplo 1, se obtuvo tejido hepático de los animales y se homogeneizó en 1 ml de TRIzol ((#15596026,

30 Thermofisher Scientific, Bleiswijk, Países Bajos). El RNA se purificó mediante RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Países Bajos).

Las concentraciones y la pureza del ARN se determinaron mediante espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000; Isogen, Maarsen, Países Bajos). La integridad del ARN se

comprobó con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Amsterdam, Países Bajos) con 6000 Nano Chips.

5 Las muestras de ARN se hibridaron con las matrices de Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0. Las matrices se normalizaron y las estimaciones de expresión de los genes se calcularon utilizando el ajuste *GC robust multiarray average background*. Para identificar los genes con expresión diferencial se utilizaron modelos lineales con aplicación de estadística t que implementan la regularización empírica de Bayes de los errores estándar.

10

Ejemplo 3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR en tiempo real).

15 El ARN total se purificó a partir de tejido hepático de los animales utilizados, que se describen en el ejemplo 1, empleando el reactivo TRIzol (ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Se utilizó 1 µg de ARN total para sintetizar ADNc mediante Super Script First Stand Synthesis System (Invitrogen, Madrid, España) y, una vez obtenido, se resuspendió en 100 µl de agua libre de ARNasas (Merck, Barcelona, España). Para la qPCR en tiempo real se utilizó SYBR Green (Invitrogen, Madrid, España).

Ejemplo 4. Análisis histológicos y morfológicos.

20 Se extrajeron los hígados de los ratones, se fijaron con 4% de paraformaldehído y se embebieron en parafina para la evaluación histológica mediante hematoxilina y eosina. Se tomaron, de forma aleatoria, fotomicrografías de las secciones teñidas en un microscopio óptico con un aumento de 20x (Nikon Eclipse Ci, Tokio, Japón).

25

Ejemplo 5. Utilización de la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA).

30 Se utilizó la base de datos TCGA para recopilar los datos de la secuenciación del ARN del CHC. El TCGA es una base de datos que incluye la caracterización molecular de más de 20.000 muestras de cáncer primario y muestras normales compatibles de 33 tipos de cáncer, entre los que se encuentra el CHC. Está disponible en UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

Ejemplo 6. Estudio estadístico.

35 Todos los análisis estadísticos se basaron en ANOVA unidireccional seguido de la

prueba post-hoc de Tukey, utilizando el *software* GraphPad Prism versión 8.0 (San Diego, CA). Una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Los datos se expresaron como media $\pm$ SD de la media (SEM).

5 Ejemplo 7. Análisis de datos.

Para el análisis de datos se utilizaron cuatro grupos de animales ($n=3$) y sus respectivos controles.

- Grupo 1 NEMO^{Δhepa} frente a Control 1 NEMO^{ff}
- Grupo 2 NEMO^{Δhepa}/TRAIL^{-/-} frente a Control 2 TRAIL^{-/-}
- 10 • Grupo 3 NEMO^{Δhepa}/TNFR1^{-/-} frente a Control 3 TNFR1^{-/-}
- Grupo 4 NEMO^{Δhepa}/ TRAIL^{-/-}/ TNFR1^{-/-} frente a Control 4 TRAIL^{-/-}/ TNFR1^{-/-}

Se analizó un total de 21.212 genes para los 24 animales. El nivel de expresión relativa de cada gen se calculó utilizando log-ratio Limma ($\log_2$) *Fold Change*, siguiendo la ecuación (1). Sea $\{x_1, \dots, x_n\}$ el nivel de expresión de los genes en el grupo de control y sea $\{y_{i1}, \dots, y_{ik}\}$ el nivel de expresión de los genes en el grupo de tratamiento i .

$$a = \frac{\sum_{j=1}^n \log_2(x_j)}{n}$$

$$b = \frac{\sum_{j=1}^k \log_2(y_{ij})}{n}$$

$$20 \quad LIMMA_i = \frac{1}{2^{b-a}} \quad (1)$$

Para determinar diferencias significativas entre cada grupo y su control, se calculó el test-t regularizado IBMT, para evitar varianzas subestimadas. Si asumimos un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, rechazaremos la hipótesis nula cuando el valor p asociado sea menor que el nivel de significancia, por lo tanto, podemos deducir que el gen se expresa en mayor (o menor) medida en el grupo con respecto al control.

Ejemplo 8. Análisis de redes de genes.

Para poder realizar el análisis de redes, necesitábamos la identificación de un gráfico que representara la estructura de los datos.

Definición 1: un gráfico $G(V,E)$ está compuesto por un conjunto de nodos (V) que

representa a los individuos de los datos, interconectados mediante relaciones representadas por aristas (E). En el caso de que la relación sea directa, las aristas se sustituyen por arcos (A) y, en caso de que las relaciones sean valiosas, el gráfico $G(V,E)$ se considera una red.

5

Un gráfico se puede representar mediante una matriz ADJ de $n \times n$ adyacencias, donde n es el número de vértices en el gráfico y

$$ADJ(i,j) = 1 \text{ si el vértice } i \text{ se conecta con el vértice } j$$

$$ADJ(i,j) = 0 \text{ en cualquier otro caso}$$

10

Consideramos una red bipartita. Como se muestra en la figura 1, los nodos del gráfico contemplan dos tipos de vértices: un primer conjunto de vértices tiene en cuenta los genes incluidos en el conjunto de datos, llamado V_1 , y un segundo conjunto de vértices incluye cada grupo bajo estudio, llamado V_2 .

15

Se dibuja un arco entre el gen i (representado como nodo i en el conjunto de vértices V_1) y el grupo j si el gen está sobreexpresado en el grupo, de acuerdo con la definición 2.

20 Definición 2: un gen i está sobreexpresado en el grupo j si el valor correspondiente de Limma sobrepasa un umbral determinado.

Dado que la expresión génica que difiere significativamente del control puede ser relevante en la detección del cáncer, tuvimos en cuenta aquellos genes cuyo aumento
25 fue significativamente mayor en el control respecto a su grupo correspondiente.

El umbral se calculó teniendo en cuenta los valores atípicos positivos del diagrama de caja de los valores de Limma para aquellos genes en los que el valor p del test-t regularizado IBMT fue superior a 0,05 (Figura 2).

30

Una vez tuvimos construida la red, determinamos la importancia de cada gen en la red mediante medidas de centralidad. En este trabajo, consideramos medidas de centralidad para redes de dominancia en las que las relaciones entre nodos están ponderadas y dirigidas a través de una relación de precedencia. Para esta clase de
35 redes, una de las medidas de centralidad más utilizadas se basa en el grado del nodo

en el gráfico: cuantas más aristas incidan en un nodo, más alta será la posición del nodo en el ranking. El grado en caso de gráfico dirigido puede obtenerse como la suma del grado de entrada y el grado de salida según la definición 3 que incluimos a continuación.

5

Definición 3: Sea $G(V,A)$ un gráfico con un conjunto de vértices V y un conjunto de arcos A . Sea $i \in V$ un vértice del gráfico G y sea ADJ la matriz de adyacencia asociada. Entonces, grado “in” es el número de conexiones que apuntan hacia dentro en un vértice, es decir,

$$\text{Grado “in” (i)} = \sum_{(i,j) \in A} ADJ_{ij}$$

10

Grado “out” es el número de conexiones que tienen origen en un vértice y apuntan hacia otro vértice, es decir,

$$\text{Grado “out” (i)} = \sum_{(j,i) \in A} ADJ_{ji}$$

15

El análisis de redes reveló 38 genes sobreexpresados en el carcinoma hepatocelular. A continuación se calculó el nivel de expresión relativa de cada gen. La Tabla 1 muestra el resumen de las principales estadísticas descriptivas. Se utilizaron puntuaciones z para cuantificar la significación de la expresión génica y se definió el nivel de significación en $=0,05$. Utilizando este umbral, 5.892 genes no mostraron diferencias significativas en comparación con sus controles.

20

Tabla 1. Parámetros estadísticos descriptivos Limma ($\log_2$) Fold Change.

		NEMO ^{Δhepa} vs NEMO ^{ff}	NEMO ^{Δhepa} / TRAIL ^{-/-} vs TRAIL ^{-/-}	NEMO ^{Δhepa} / TNFR1 ^{-/-} vs TNFR1 ^{-/-}	NEMO ^{Δhepa} /TRAIL ^{-/-} /TNFR1 ^{-/-} vs TRAIL ^{-/-} /TNFR1 ^{-/-}
N (genes)		21.212	21.212	21.212	21.212
Media		-0,2763	-0,2451	-0,2353	-0,0871
Mediana		-1,0553	-1,0485	-1,0413	-1,0138
Desviación estándar		1,2810	1,3482	1,3167	1,2092
Mínimo		-13,1684	-34,4359	-46,1525	-10,1134
Máximo		19,7381	34,1183	20,3972	15,9939
Percentil	75	1,0579	1,0647	1,0598	1,0691
	95	1,5797	1,5839	1,5379	1,3738

25

Para ilustrar y analizar el impacto de los patrones de expresión génica, se construyó el gráfico de red considerando un arco que conectaba cada grupo de tratamiento con

un gen si la expresión relativa de ese gen se consideraba un valor atípico positivo en el diagrama correspondiente (Figura 3). Puede observarse que 38 genes de los 21.212 analizados (0,17%) estaban claramente sobreexpresados, según la definición 2, en al menos uno de los grupos. Además, había un total de 71 arcos en la red, lo que representa una media de dos grupos en la sobreexpresión para cada gen detectado como sobreexpresado. La Tabla 2 representa el grado “out” para cada gen sobreexpresado en la red.

Tabla 2. Valor de grado “out” para cada gen en la red

Nombre del gen	Grado “out”
CDKN1A	4
MME, MKI67, NRG1, CDK1, EMP1, MTMR11, TNC, AKR1C18, ANXA2, NTRK2	3
GPNMB, MMP13, TUBB6, CLEC7A, PRRG4, CXCL14, CIB3, PRR11, S100A11	2
SAA2, LCN2, SAA1, MYBL1, MFSD2A, TUBA8, THBS1, MS4A7, LGALS1, CYP4A14, LUM, CDCA3, MCM6, SERPINE1, ABCB1B, CIDEA, H2AFZ, TIMP1, GABRB3	1

10

Se observó la influencia del gen Cdkn1a en los cuatro grupos experimentales respecto a sus grupos de control y la influencia de los genes MME, MKI67, NRG1, CDK1, EMP1, MTMR11, TNC, AKR1C18, ANXA2, NTRK2 en tres grupos de tratamiento. En menor medida, la influencia de los genes GPNMB, MMP13, TUBB6, CLEC7A, PRRG4, CXCL14, CIB3, PRR11, S100A11 en dos grupos experimentales y, por último, la influencia de SAA2, LCN2, SAA1, MYBL1, MFSD2A, TUBA8, THBS1, MS4A7, LGALS1, CYP4A14, LUM, CDCA3, MCM6, SERPINE1, ABCB1B, CIDEA, H2AFZ, TIMP1, GABRB3 en un solo grupo experimental. Con respecto a los grupos, se sobreexpresaron 22 genes en el primer grupo, 24 en el segundo, 17 en el tercero y 8 en el cuarto.

20

Ejemplo 9. Modelos experimentales de CHC y firma génica.

Para obtener una firma génica propia del cáncer de hígado, probamos los genes obtenidos en el ejemplo 8 para el pronóstico del CHC en dos modelos diferentes de generación espontánea de CHC: ratones NEMO^{Δhepa} y ratones c-MYC^{tg}.

25

Sabemos que los ratones NEMO^{Δhepa} macho de 12 meses de edad muestran la presencia de múltiples tumores. El análisis histológico revela la presencia de tumores hepáticos malignos correspondientes a CHC bien diferenciados o moderadamente diferenciados. Estos fenómenos están acompañados de signos de esteatohepatitis e infiltración de células inmunitarias en el parénquima hepático. Además, los hepatocitos presentan displasia, una condición que también se observa en pacientes con hepatopatía crónica.

Por otro lado, se sabe que los ratones transgénicos c-MYC^{tg} presentan una alta tasa de proliferación de hepatocitos y, por tanto, predisposición al CHC. La aparición de neoplasias hepáticas benignas se produce en ratones c-MYC^{tg} de ocho meses de edad, mientras que el CHC se desarrolla a la edad de diez meses. El tipo histológico de CHC observado con mayor frecuencia en los animales c-MYC^{tg} es trabecular o sólido y va desde tumores bien diferenciados a tumores poco diferenciados asociados a polimorfismo celular, atipia y áreas de necrosis hemorrágica.

Por lo tanto, tratamos de explorar la expresión de los genes identificados en el ejemplo 8 en estos dos modelos experimentales de CHC y hallamos una regulación diferencial en ocho genes. En concreto, observamos que *Mki67*, *Emp1*, *Mmp13*, *Lcn2* y *Timp1* estaban significativamente regulados al alza en el tejido tumoral de NEMO^{Δhepa} en comparación con el tejido hepático de NEMO^{ff} (Figuras 4A-F). Sin embargo, la expresión de *Cxcl14*, *Saa1* y *Saa2* estaba regulada a la baja en el hígado NEMO^{Δhepa} en comparación con el hígado NEMO^{ff} (Figuras 4G-H). Estos resultados también se comprobaron y validaron en tejido tumoral c-MYC^{tg} (Figuras 5A-H), donde se comprobó que *Mki67*, *Emp1*, *Mmp13*, *Lcn2* y *Timp1* estaban significativamente regulados al alza y se observó, también, una tendencia al aumento de *Saa1* y *Saa2* significativa en los tumores hepáticos c-MYC^{tg}.

En este punto, consideramos que la firma génica para el diagnóstico del cáncer de hígado consistía en la desregulación de *Mki67* (secuencia publicada en GenBank, NG_047061.1), *Emp1* (NM_001423.3), *Mmp13* (NG_021404.1), *Lcn2* (NM_005564.5), *Timp1* (NG_012533.1), *Cxcl14* (NM_004887.5), *Saa1* (NM_199161.5) y *Saa2* (NM_030754.5) y, en los ensayos en ratón, se utilizaron los cebadores definidos en SEQ ID NO: 1-18 (Tabla 4).

Ejemplo 10. Establecimiento de una firma génica para el diagnóstico en TCGA.

A continuación, comprobamos la relevancia de los genes identificados y evaluados en modelos murinos preclínicos de carcinogénesis hepática, como se describe en el ejemplo 9, en la base de datos TCGA y comparamos la expresión de cada gen en

5 tejido normal y tejido de tumor primario de pacientes con CHC. Se observó un aumento significativo de MKI67, LCN2 Y TIMP1 en el tejido de tumor primario de pacientes con CHC en comparación con el tejido circundante normal (Fig. 6A-C). Además, CXCL14, SAA1 Y SAA2 se redujeron significativamente en el tejido de tumor primario (TP) de

10 pacientes con CHC en comparación con el tejido circundante normal (N) (Fig. 6D-F). No se observaron diferencias en la expresión de Emp1 ni de Mmp13 (Fig. 7A-B).

Posteriormente, realizamos un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comprender la puntuación de riesgo relacionada con una mayor o menor expresión de nuestra firma génica diagnóstica y afectar así a la tasa de supervivencia general (SG).

15 Los pacientes con mayor expresión de MKI67 presentaron una SG significativamente menor (Fig. 6G). Curiosamente, y a pesar de que no hubo diferencias significativas en los niveles de Mmp13 entre el tumor primario y el tejido normal, una expresión más alta se asoció con una SG significativamente menor (Fig. 6H). Además, la expresión diferencial de LCN2, TIMP1, CXCL14 Y SAA2 no se asoció a cambios en la tasa de

20 SG de los pacientes con CHC (Fig. 8A-D).

Ejemplo 11. Establecimiento de una firma génica para el diagnóstico en cohortes de pacientes con CHC.

A continuación, observamos la expresión de los diferentes genes de nuestra firma

25 genética en diferentes cohortes de humanos. Dados los resultados obtenidos hasta el momento, eliminamos de la firma el gen SAA1 por no considerar su expresión suficientemente consistente con los objetivos perseguidos. Todos los protocolos humanos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España), según las guías institucionales y de Buenas Prácticas

30 Clínicas (Protocolo número PI17/02287) y en cumplimiento de la declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes o de sus familiares. Se incluyeron muestras de pacientes con CHC que se sometieron a resección quirúrgica o trasplante de hígado (Tabla 3): muestras congeladas que comprendían tejido de CHC (n = 24) y tejido adyacente no tumoral (NTAT) (n = 24).

35 Todas estas muestras fueron obtenidas del Biobanco de Andalucía (Nodo Córdoba),

evaluadas mediante histología hepática y el diagnóstico fue confirmado por dos patólogos independientes y experimentados. Los datos clínicos de los pacientes se obtuvieron de informes médicos electrónicos. También la expresión genética de 3 cohortes de pacientes disponibles in silico se descargó de los conjuntos de datos de GEO: 4 cohortes de RNA-seq (GSE77314, GSE94660, GSE124535 y GSE114564) y 1 cohorte de microarray (GSE89377).

Tabla 3. Procedencia de las muestras utilizadas

	Retrospectiva
Pacientes [n]	24
Edad, y [mediana (IQR)]	65.5 (57-71.25)
Sexo [n (%)]	
- Varón	21 (87.5)
- Hembra	3 (12.5)
Etiología [n (%)]	
- HCV	6 (25)
- Alcohol	6 (25)
- HBV	4 (17)
- NASH	6 (25)
- HBV+Alcohol	2 (8)

Se utilizaron los cebadores específicos para transcripciones humanas (LCN2, MMP13, MKI67, EMP1, SAA2, CXCL14 y Timp1) descritos en SEQ ID NO: 19-32 y que se indican en la Tabla 4, donde también se indican los cebadores utilizados para normalizar la expresión de genes (GAPDH, HPRT, ACTB), SEQ ID NO: 33-38. Las reacciones de qPCR convencionales se llevaron a cabo utilizando el sistema de PCR en tiempo real CFX Duet y iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Madrid, España). Para controlar las variaciones en la eficiencia de la reacción de retrotranscripción, los números de copias de ARNm de las diferentes transcripciones analizadas se ajustaron mediante el factor de normalización, calculado con los niveles de expresión de ACTB, GAPDH y HPRT utilizando GeNorm 3.3. Los datos se evaluaron para determinar la heterogeneidad de la varianza mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba T, la prueba U de Mann-Whitney o mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba exacta de corrección de Fisher. Las correlaciones se estudiaron mediante la prueba de correlación de Pearson o Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). El análisis

de la expresión de ARNm se realizó con MetaboAnalyst 6.0. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos representan medias $\pm$ error estándar de la media. Los asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$) indican diferencias estadísticamente significativas entre diferentes condiciones.

5

Tabla 4. Cebadores utilizados para determinar la expresión de los genes analizados.

Número	Secuencia (5' → 3')	Descripción
SEQ ID NO: 1	TTTGTCTCGGTGGCGTTATCC	<i>Mki67</i> R Ratón
SEQ ID NO: 2	GAGGAGAAACGCCAACCAAGAG	<i>Mki67</i> F Ratón
SEQ ID NO: 3	GGTGGCTGACGAAGGTGTTA	<i>Saa2</i> R Ratón
SEQ ID NO: 4	GGCTTTAGGCATCAACGCAG	<i>Saa2</i> F Ratón
SEQ ID NO: 5	GCAGTTTGAAAGGTGGCTGG	<i>Cxcl14</i> R Ratón
SEQ ID NO: 6	ACAACGAGACATCGGGTGTT	<i>Cxcl14</i> F Ratón
SEQ ID NO: 7	AAACTCGTTGTTCCGCTTGC	<i>Emp1</i> R Ratón
SEQ ID NO: 8	ACGGGTTCGATTCCCGTAAG	<i>Emp1</i> F Ratón
SEQ ID NO: 9	GCGTTTTTACGGATGGAGCC	<i>Lcn2</i> R Ratón
SEQ ID NO:10	GCGATGCACTGAAAACCTCG	<i>Lcn2</i> F Ratón
SEQ ID NO: 11	AGTGACGATGGAACCTGTGTC	<i>Mmp13</i> R Ratón
SEQ ID NO: 12	GGGACAAAAGAGGACAGATCC	<i>Mmp13</i> F Ratón
SEQ ID NO: 13	GCACCATTCAAAGCCACATCA	<i>Timp1</i> R Ratón
SEQ ID NO: 14	CGGCCAAGATATCCTACATTGC	<i>Timp1</i> F Ratón

SEQ ID NO: 15	TGTCTGTTGGCTTCCTGGTCAG	<i>Saa1</i> R Ratón
SEQ ID NO: 16	GGAGTCTGGGCTGCTGAGAAAA	<i>Saa1</i> F Ratón
SEQ ID NO: 17	AACCTGCCAAGTATGATGACATCA	<i>Gapdh</i> R Ratón
SEQ ID NO: 18	TGTTGAAGTCACAGGAGACAACT	<i>Gapdh</i> F Ratón
SEQ ID NO: 19	CAGACCCATTTACTTGTGTTGGA	MKI67 R Humano
SEQ ID NO: 20	ACGCCTGGTTACTATCAAAAGG	MKI67 F Humano
SEQ ID NO: 21	GCCGATGTAATTGGCTTCTCTCA	SAA2 R Humano
SEQ ID NO: 22	GCTTCTTTTCGTTCTTGGCG	SAA2 F Humano
SEQ ID NO: 23	GTTCCAGGCGTTGTACCAC	CXCL14 R Humano
SEQ ID NO: 24	CGCTACAGCGACGTGAAGAA	CXCL14 F Humano
SEQ ID NO: 25	CCGTGGTGATACTGCGTTCC	EMP1 R Humano
SEQ ID NO: 26	GTGCTGGCTGTGCATTCTTG	EMP1 F Humano
SEQ ID NO: 27	CCCCTGGAATTGGTTGTCCTG	LCN2 R Humano
SEQ ID NO: 28	CCACCTCAGACCTGATCCCA	LCN2 F Humano
SEQ ID NO: 29	GAACCCCGCATCTTGGCTT	MMP13 R Humano
SEQ ID NO: 30	ACTGAGAGGCTCCGAGAAATG	MMP13 F Humano
SEQ ID NO: 31	ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG	TIMP1 R Humano

SEQ ID NO: 32	CTTCTGCAATTCCGACCTCGT	TIMP1 F Humano
SEQ ID NO: 33	AACCTGCCAAATATGATGACATCA	GAPDH R Humano
SEQ ID NO: 34	TGTTGAAGTCAGAGGAGACCACCT	GAPDH F Humano
SEQ ID NO: 35	ATTTGGACTCTCCCACGCTG	ACTB R Humano
SEQ ID NO: 36	TCCGAGTTGCTAGTGTGCTG	ACTB F Humano
SEQ ID NO: 37	CAGCATGAATGCCACATCGG	HPRT R Humano
SEQ ID NO: 38	CAGTGGCTTGCAAGGTTTCC	HPRT F Humano

En cuanto a los resultados obtenidos en las diferentes cohortes, pudimos observar los siguientes puntos:

- 5 · **MKI67** y **LCN2**: los niveles de mRNA son elevados y están significativamente sobreexpresados en tejidos con CHC cuando se comparan con tejidos no tumorales en todas las cohortes de pacientes estudiados (cohorte retrospectiva, es decir, una cohorte de individuos que comparten un factor de exposición se compara con otro grupo de control de individuos que no son expuestos a ese factor) y cinco conjuntos
- 10 de datos in silico sobre CHC) (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).
- **CXCL14**: niveles de mRNA claramente infraexpresados en los tejidos con CHC en comparación con los tejidos no tumorales en todas las cohortes de pacientes estudiadas, siendo esta infraexpresión significativa en el 87,5% de las cohortes (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).
- 15 · **MMP13**: tiende a estar sobreexpresado en tejidos de CHC en comparación con tejidos no tumorales (GSE94660) (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).
- **TIMP1**: tiende a sobreexpresarse en los tejidos de CHC en comparación con los tejidos

no tumorales, en casi todas las cohortes (87.5%, todas menos GSE164760); sin embargo, esta tendencia no fue significativa (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).

- **EMP1:** parece que aumenta su expresión de las cohortes en tejidos de CHC en comparación con tejidos no tumorales, siendo esta tendencia altamente significativa (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).

- **SAA2:** sus niveles de expresión son bastante heterogéneos: en el 66% de las cohortes disminuyó su expresión, de forma significativa en dos cohortes (GSE77314 y GSE114564) (Fig. 9A-D, Fig.10A-B).

10 Teniendo en cuenta todos los resultados descritos aquí, decidimos excluir también TIMP1 de la firma génica. Por lo tanto, la firma génica para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de hígado consiste en la desregulación de la expresión de MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 Y SAA2.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la detección temprana y/o el pronóstico del cáncer hepático a partir de muestras biológicas aisladas de un paciente con lesiones de hígado que comprende:
- 5 a) determinar en la muestra biológica la expresión de un conjunto de genes que consiste en MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 Y SAA2;
- b) comparar la expresión del conjunto de genes del paso a) con la expresión de los mismos genes en muestras de referencia de tejido normal.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 en el que la expresión del conjunto de genes del paso a) se normaliza con respecto a la expresión de un gen constitutivo.
3. Método según la reivindicación 2 en el que el gen constitutivo se selecciona del
- 15 grupo formado por: GAPDH, ACTB, HPRT.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la determinación de la expresión del conjunto de genes incluye una etapa de amplificación mediante qPCR.
- 20 5. Método según la reivindicación 4 en el que la determinación de la expresión del conjunto de genes incluye la detección del ADNc de cada gen.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la determinación de
- 25 la expresión del conjunto de genes incluye la detección del ARNm correspondiente a cada gen.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la expresión del conjunto de genes se determina mediante la utilización de las parejas de cebadores
- 30 descritos en SEQ ID NO: 19-32.
8. Método según la reivindicación 3 en el que la expresión del gen constitutivo se determina mediante la utilización de las parejas de cebadores descritos en SEQ ID
- 35 NO: 33-38.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se detecta y/o pronostica cáncer hepático cuando los genes MKI67, LCN2, MMP13 y EMP1 están sobreexpresados y los genes CXCL14 y SAA2 están infraexpresados.

- 5 10. Kit para la detección temprana y el pronóstico del cáncer hepático a partir de muestras biológicas aisladas de un paciente con lesiones de hígado que comprende un conjunto de cebadores con los que se determina la expresión del conjunto de genes que consiste en MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 Y SAA2.
- 10 11. Kit según la reivindicación 10 en el que el conjunto de cebadores consiste en las parejas de cebadores descritos en SEQ ID NO: 19-32.
- 15 12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10-11 que incluye cebadores para la determinación de la expresión de un gen constitutivo.
- 15 13. Kit según la reivindicación 12 en el que el gen constitutivo se selecciona entre ACTB, GAPDH y/o HPRT.
- 20 14. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 12-13 en el que se incluye cualquiera de las parejas de cebadores descritas en SEQ ID NO: 33-38.
- 25 15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10-14 que incluye los reactivos necesarios para la amplificación de los fragmentos de los genes MKI67, EMP1, MMP13, LCN2, CXCL14 Y SAA2 determinados por las parejas de cebadores descritos en SEQ ID NO: 19-32 y/o cualquiera de las parejas de cebadores descritas en SEQ ID NO: 33-38.
- 30 16. Kit según la reivindicación 15 que incluye reactivos para la detección de los fragmentos amplificados.

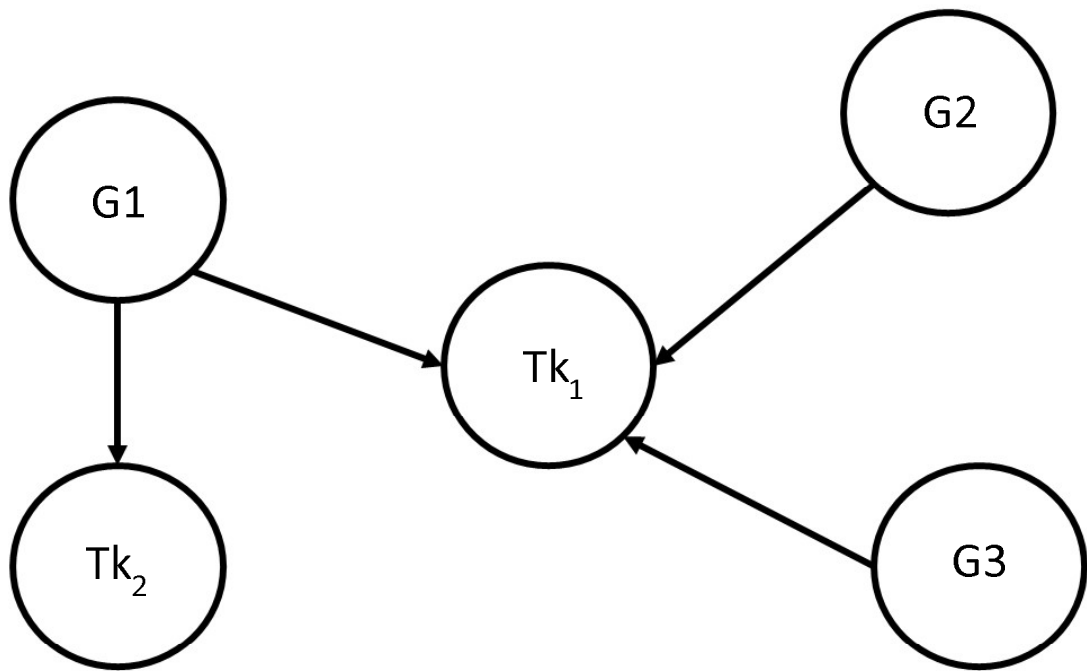


Fig. 1

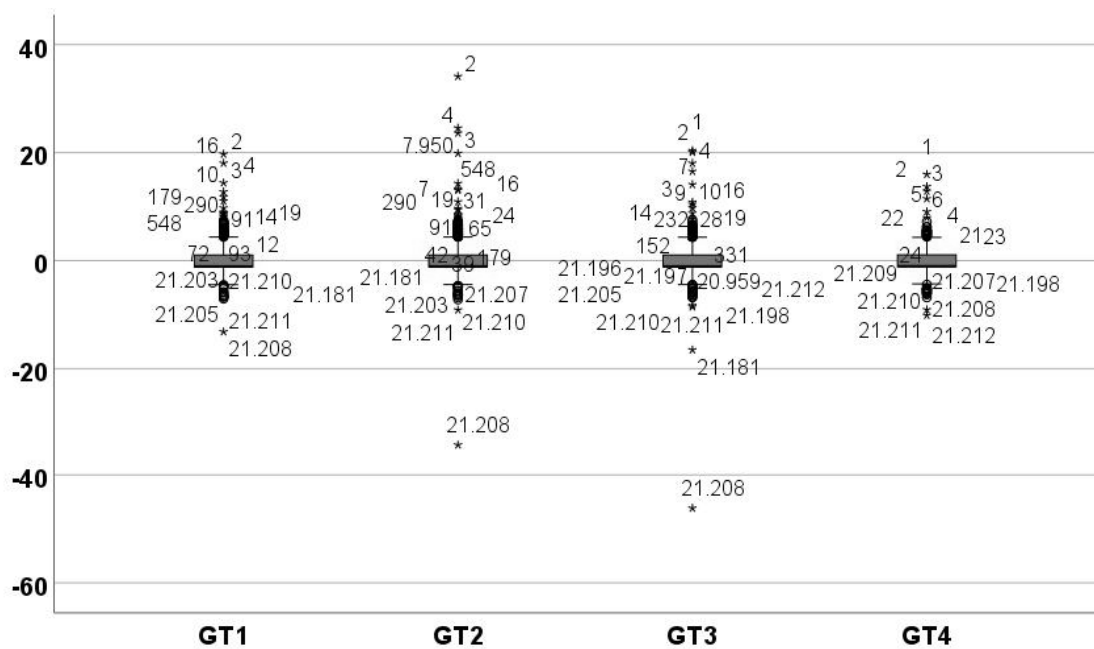


Figura 2

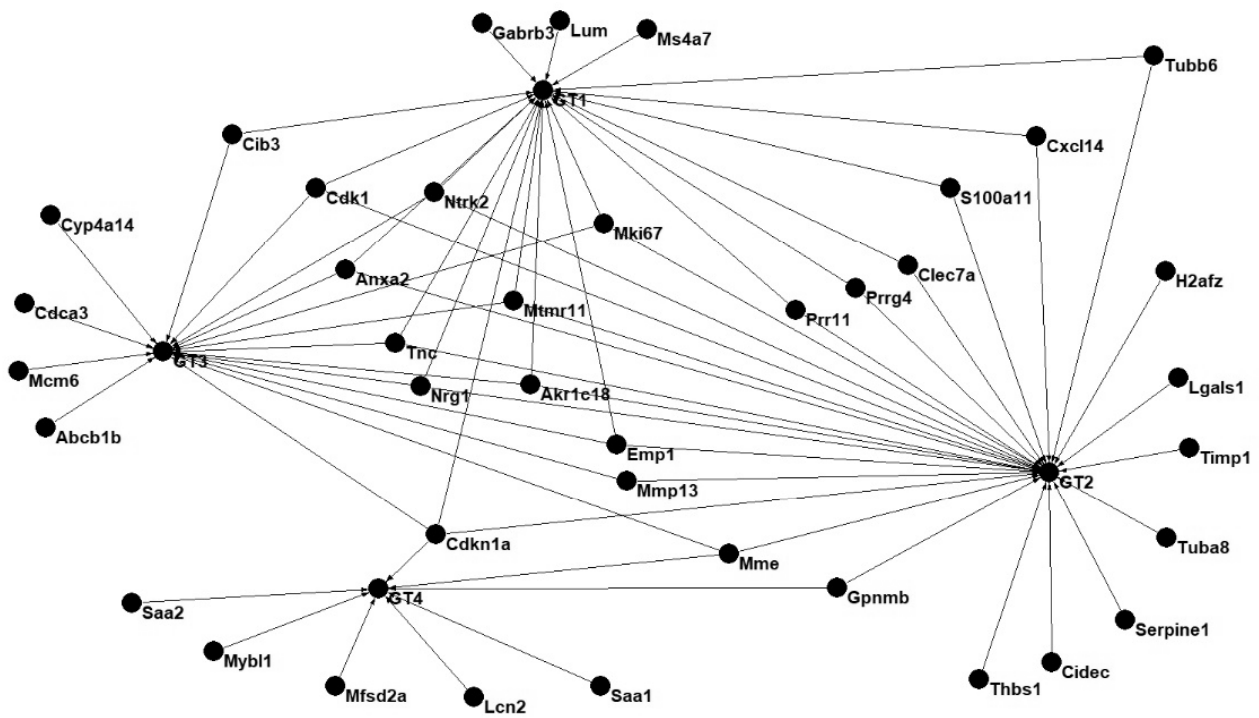


Fig. 3

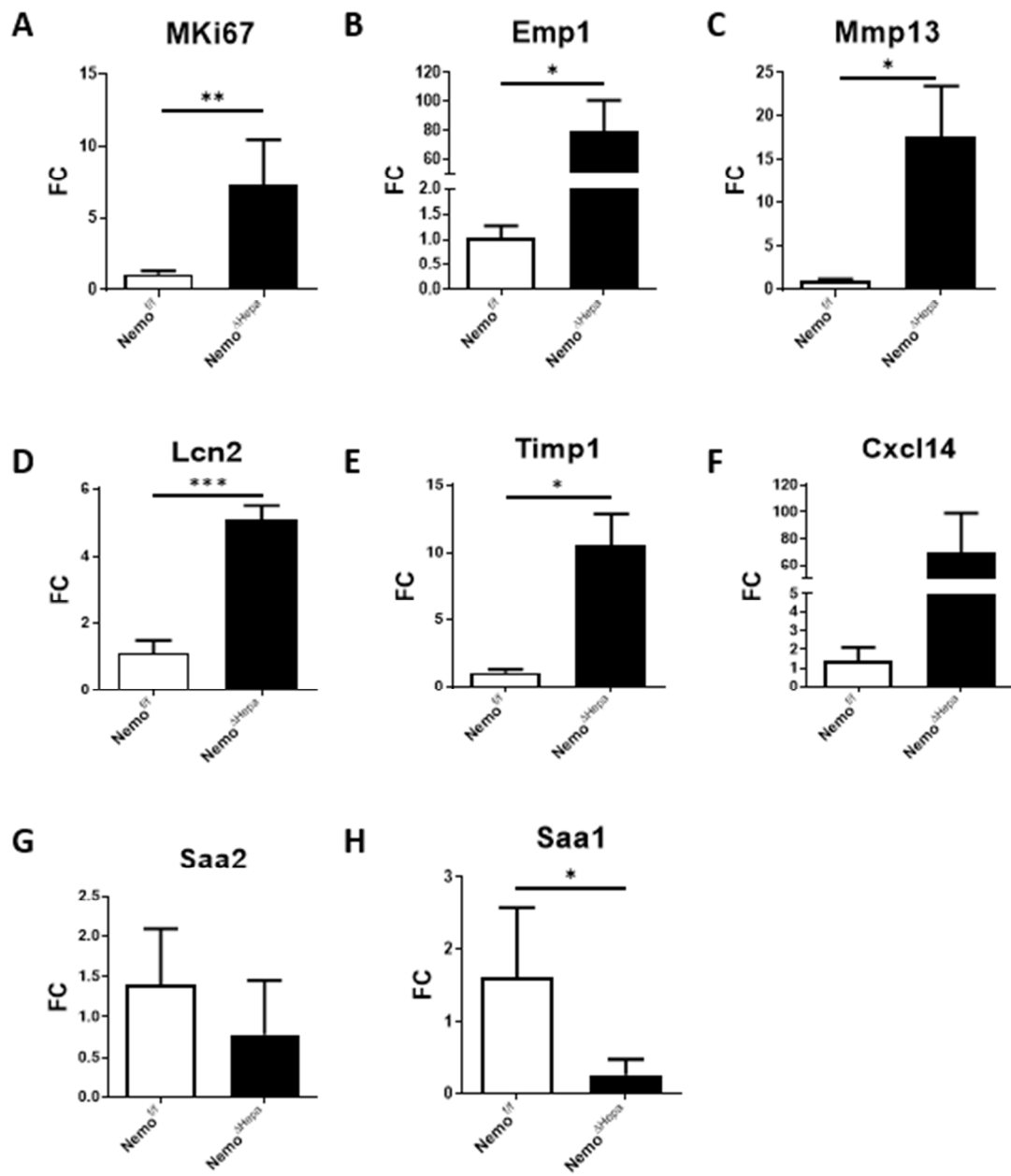


Fig. 4

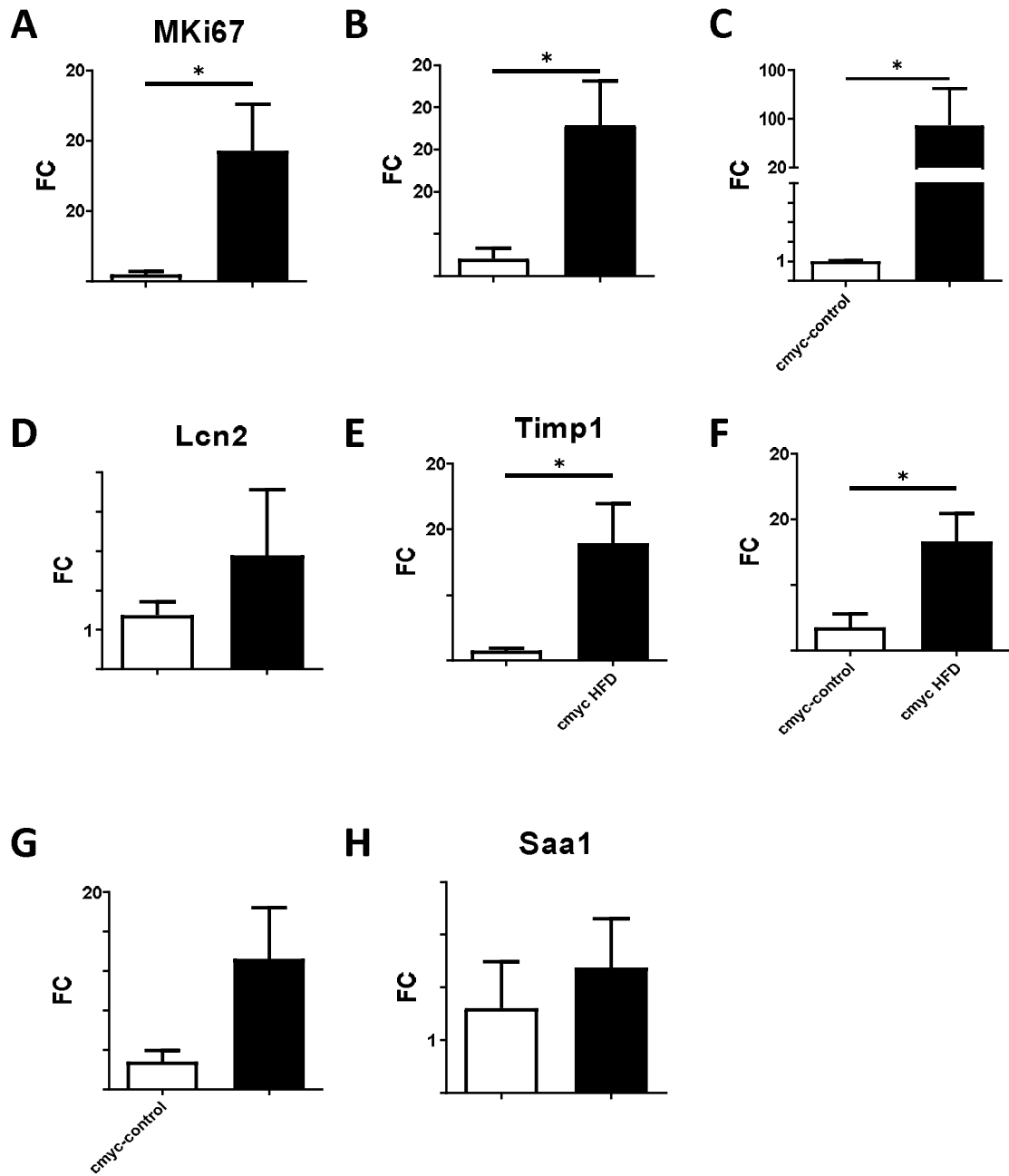


Fig. 5

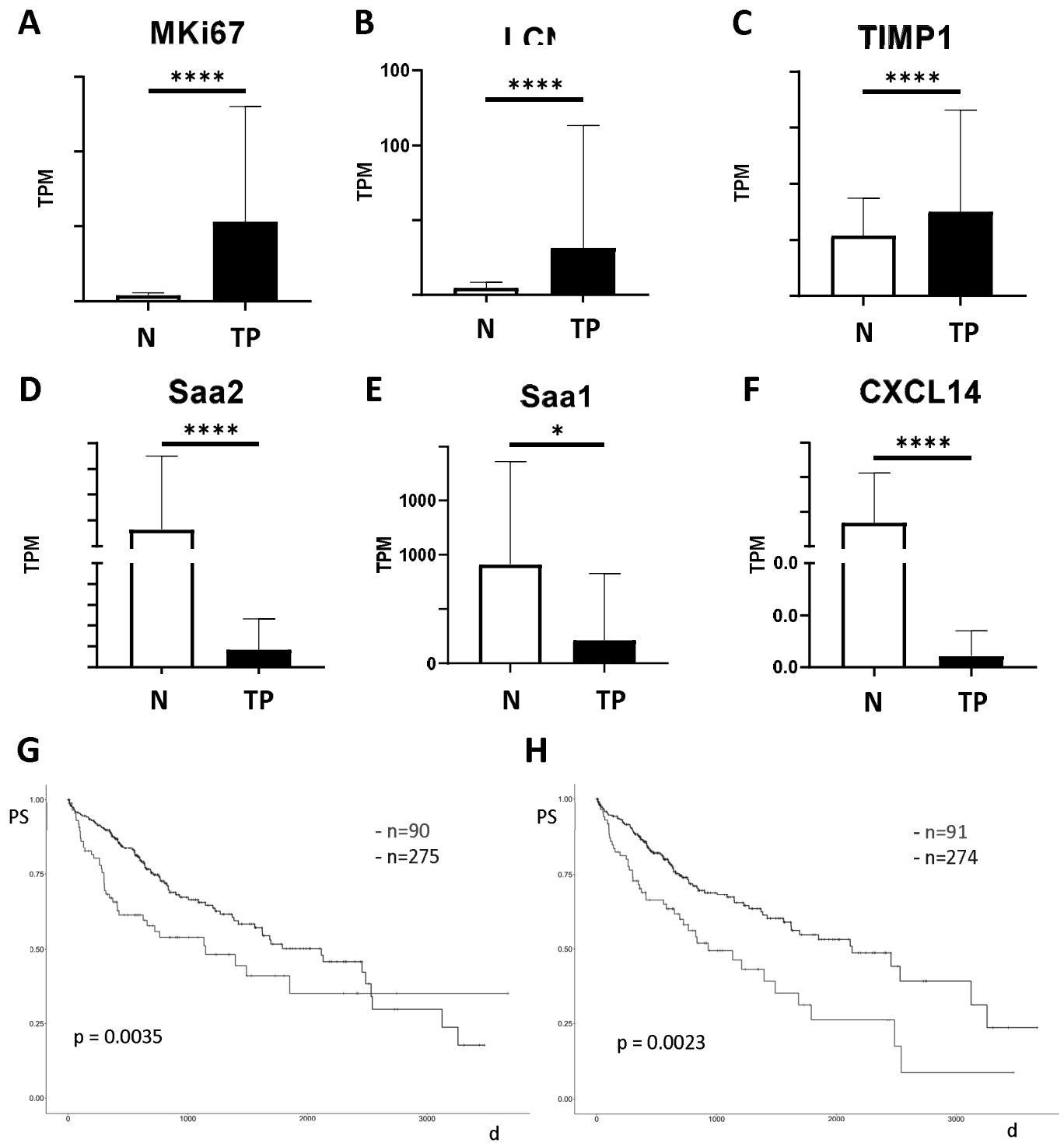


Fig. 6

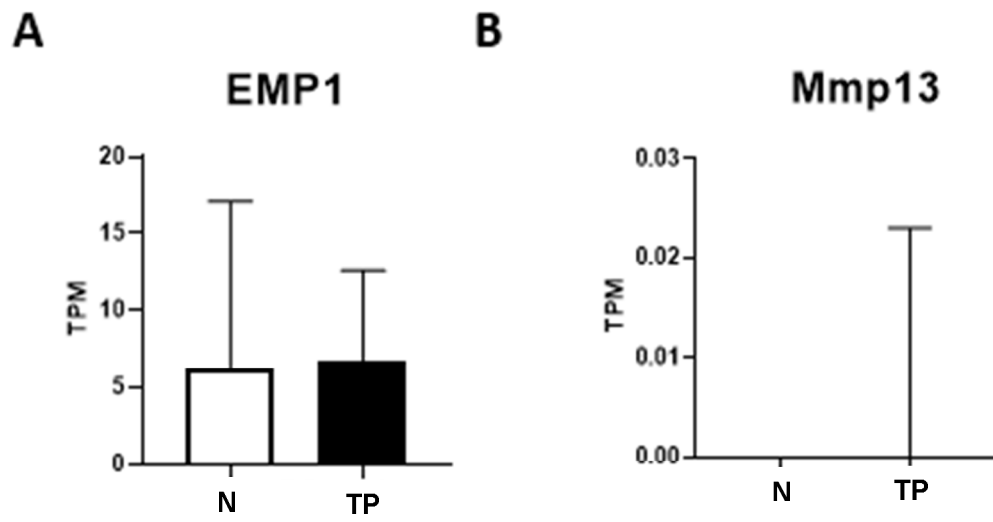


Fig. 7

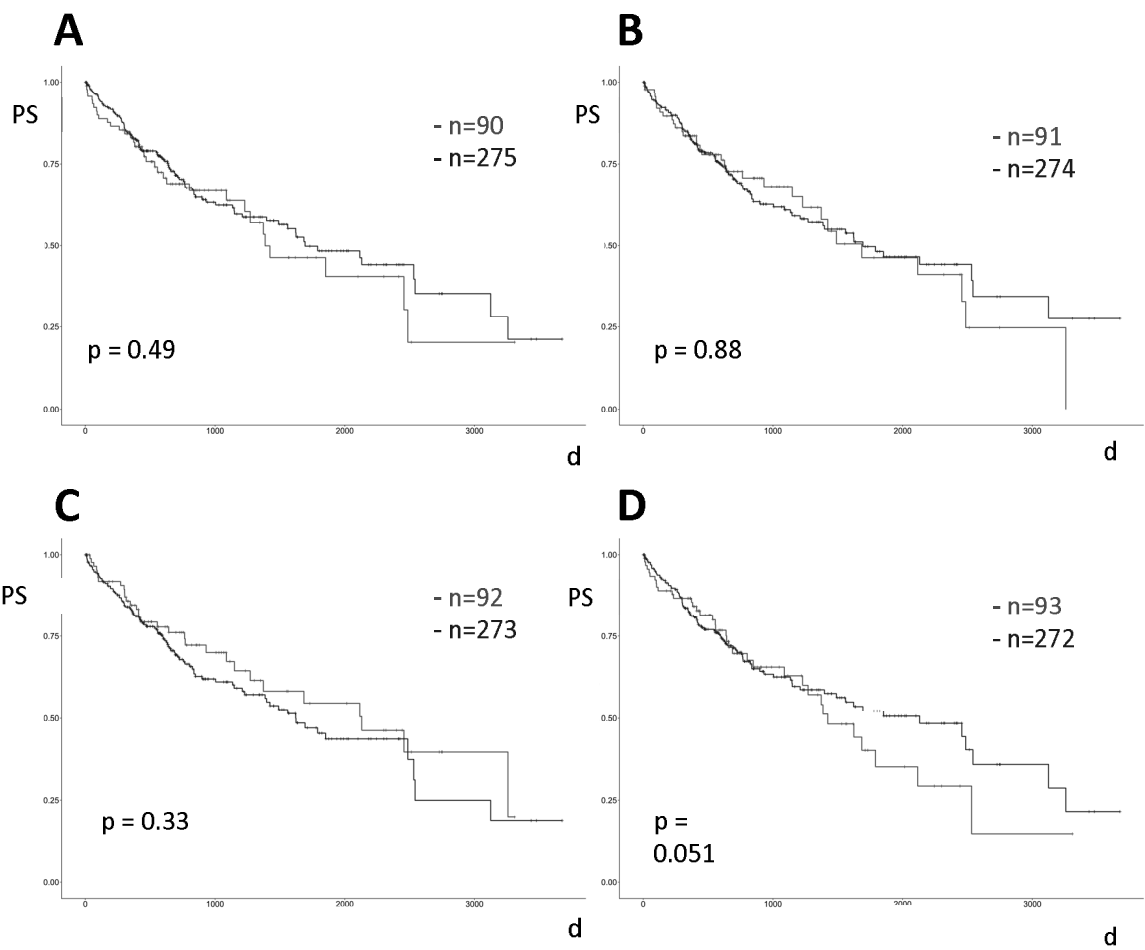
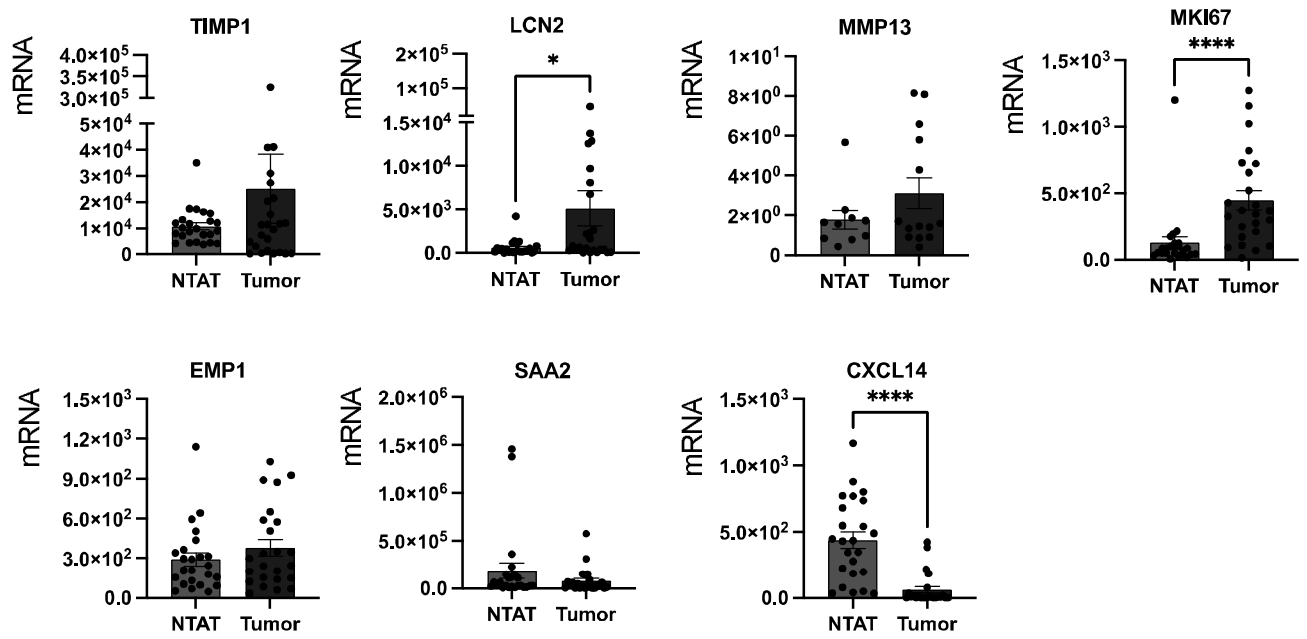


Fig. 8

A



B

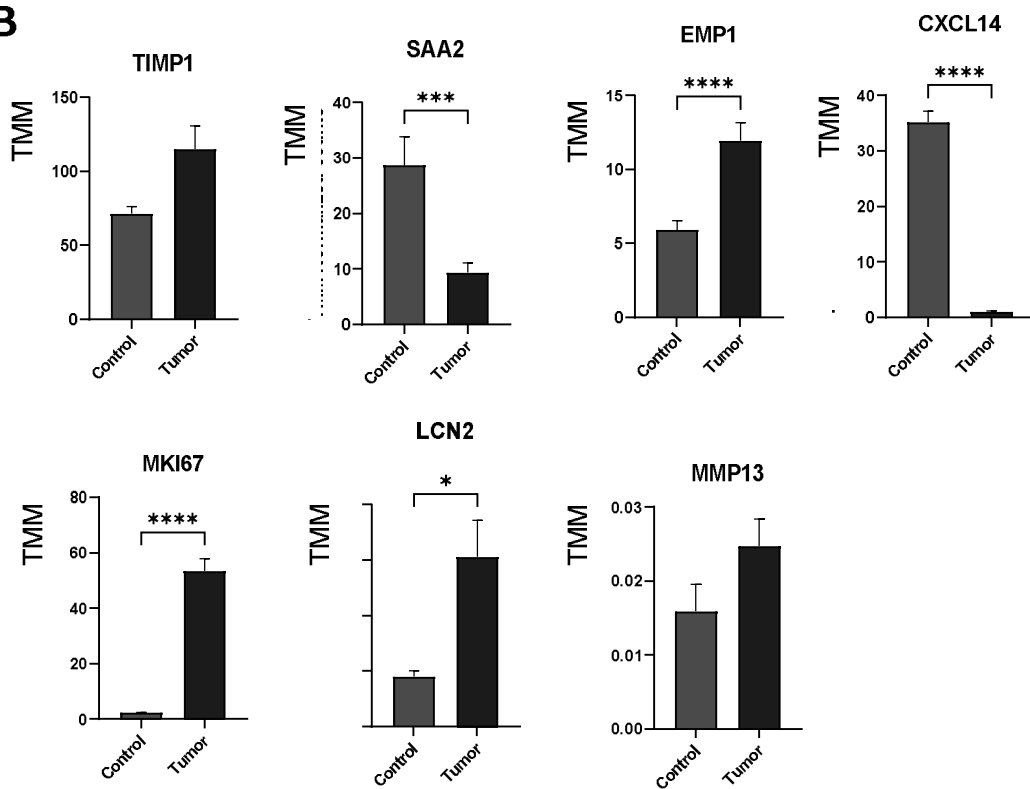
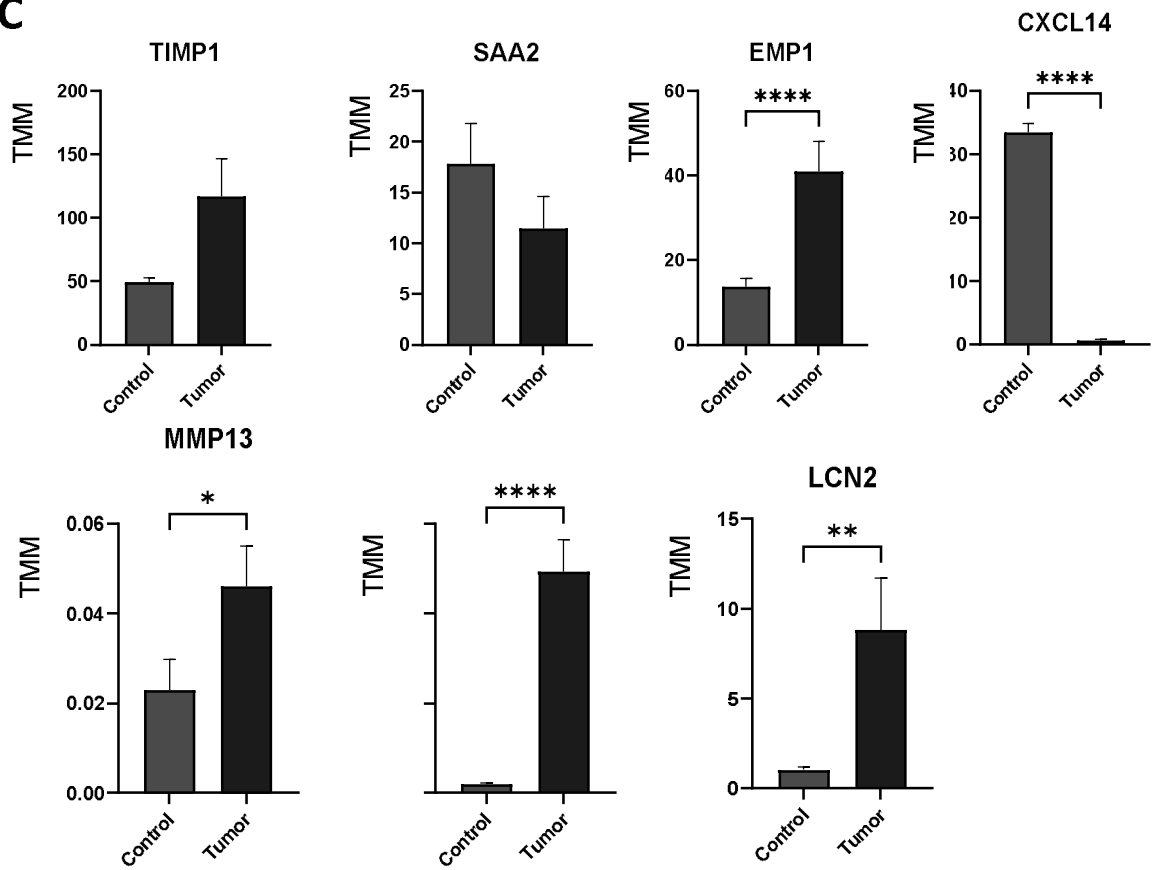


Fig. 9A-B

C



D

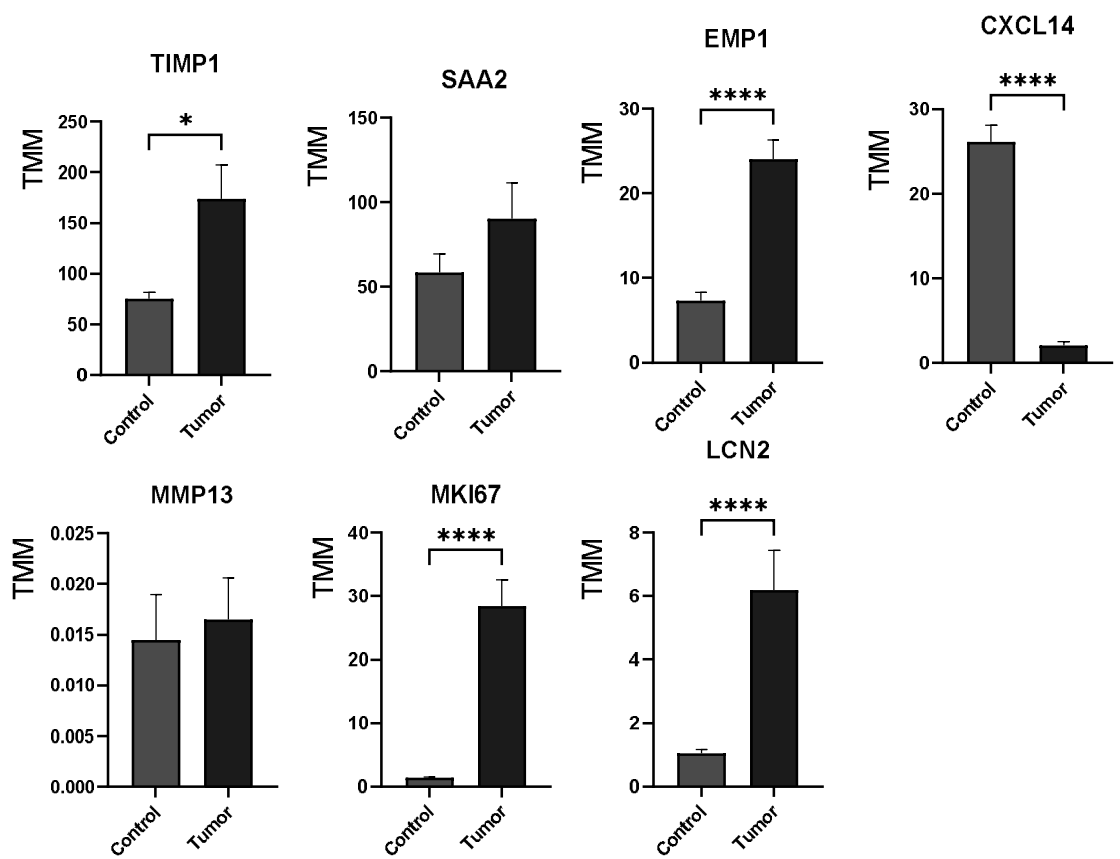


Fig. 9C-D

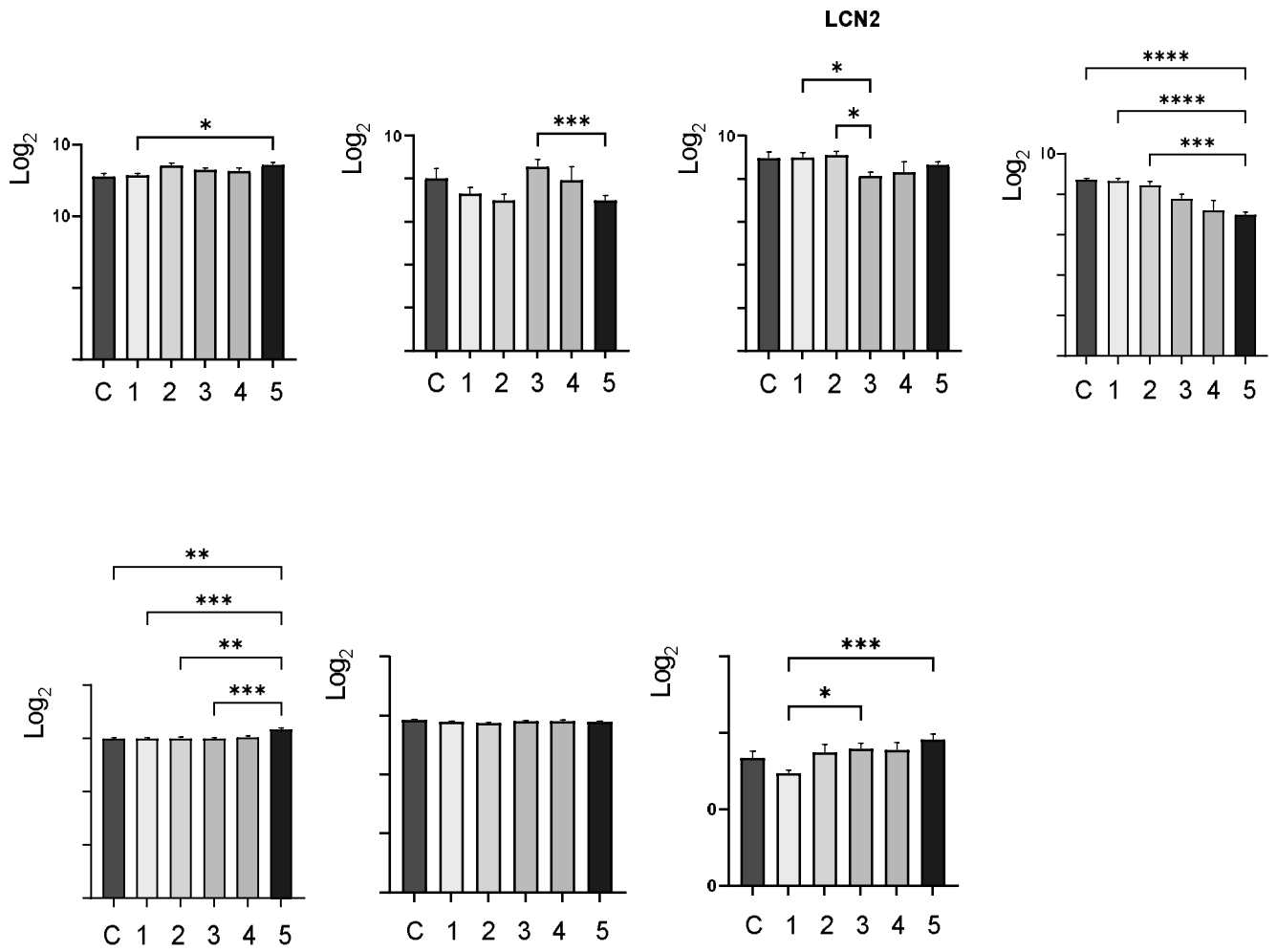


Fig. 10A

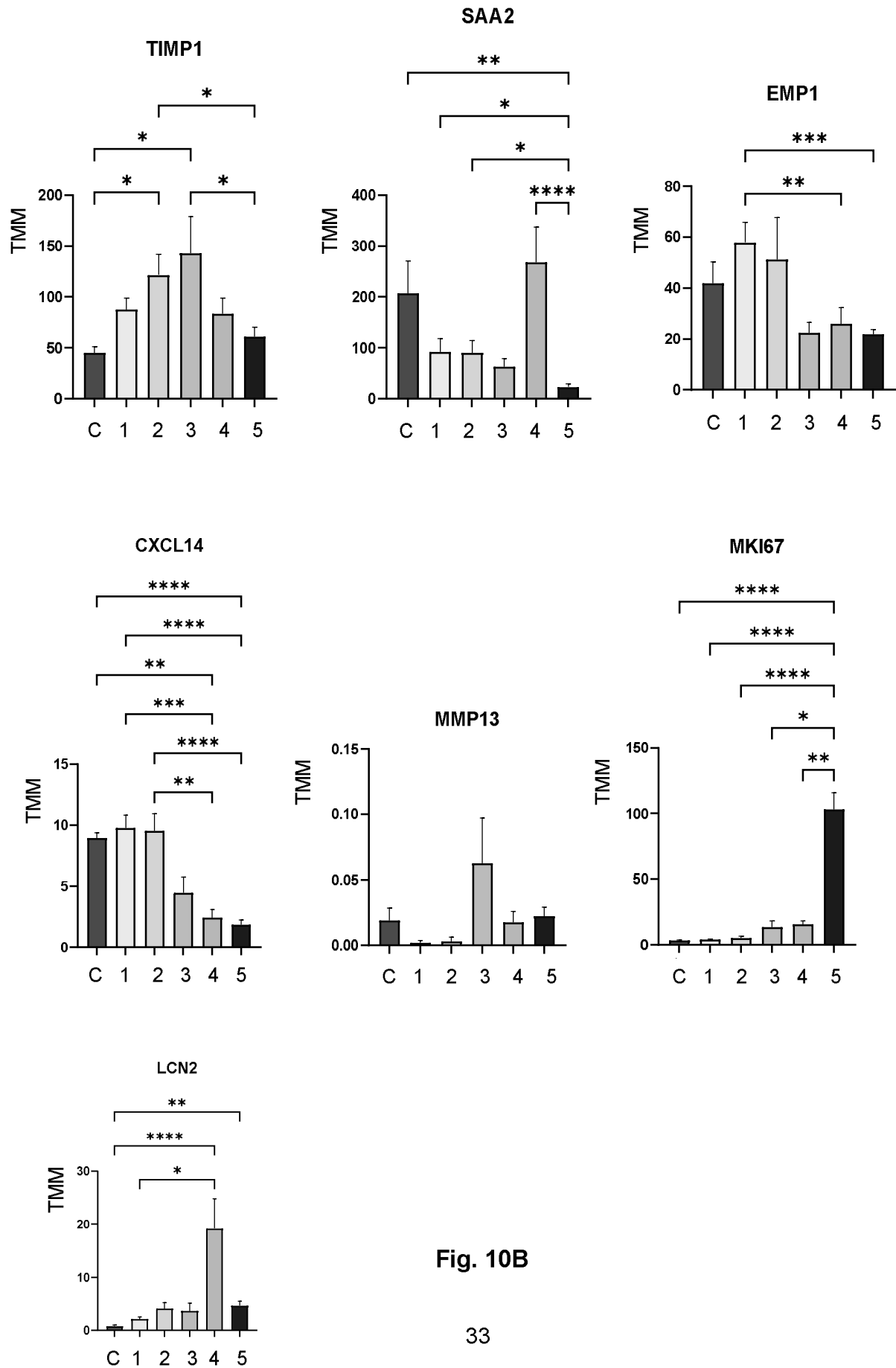


Fig. 10B



21 N.º solicitud: 202430583
22 Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WU S -Y et al. Correlation of MKI67 with prognosis, immune infiltration, and T cell exhaustion in hepatocellular carcinoma. BMC Gastroenterology, 2021, Vol. 21, artículo nº 416 [en línea][recuperado el 11/12/2024], ISSN 1471-230X (electronic), <DOI:10.1186/s12876-021-01984-2>. Abstract, materiales y métodos, páginas 4, 7 y 9.	1-16
X	WANG, W. et al. Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . Cancer Science, 2013, Vol. 104, Nº 11, páginas 1523 - 1531 [en línea][recuperado el 13/12/2024] ISSN 1349-7006 (electronic), <DOI:10.1111/cas.12279>. Abstract, página 1523, figura 1.	1-16
X	WANG, C. et al. Clusterin facilitates metastasis by EIF3I/Akt/MMP13 signaling in hepatocellular carcinoma. Oncotarget 2014, Vol. 6, Nº 5, páginas 2903 - 2916 [en línea][recuperado el 16/12/2024], ISSN 1949-2553 (electronic), <DOI:10.18632/oncotarget.3093>. Abstract; página 2907, figura 3.	1-16
A	CAI, J. et al. Prognostic biomarker identification through integrating the gene signatures of hepatocellular carcinoma properties. EBioMedicine, 2017, Vol. 19, Páginas 18 - 30 [en línea] [recuperado el 16/12/2024] Recuperado de Internet <URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.014>, ISSN 2352-3964 (electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.014>	1-16
A	PINTO-MARQUES, H. et al. A gene expression signature to select hepatocellular carcinoma patients for liver transplantation. Annals of Surgery, 2022, Vol. 276, Nº 5, páginas 868 - 874 [en línea] [recuperado el 16/12/2024], ISSN 0003-4932, <DOI:10.1097/SLA.0000000000005637>	1-16

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 18.12.2024	Examinador A. Ugidos Valladares	Página 1/2
--	--	---------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/6886 (2018.01)
C12Q1/6851 (2018.01)
C12Q1/686 (2018.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, INTERNET, XPESP, NPL y bases de texto TXT.